

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Implication des Rho GTPases sur l'activation de la MAPK p38 induite par la déplétion en cholestérol dans les kératinocytes

BRUMENIL, Virginie

Award date:
2005

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**IMPLICATION DES RHO GTPASES SUR L'ACTIVATION DE LA MAPK p38 INDUITE PAR LA
DEPLETION EN CHOLESTEROL DANS LES KERATINOCYTES**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Virginie BRUMENIL
Juin 2005

IMPLICATION DES RHO GTPASES SUR L'ACTIVATION DE LA MAPK p38 INDUITE PAR LA DEPLETION EN CHOLESTEROL DANS LES KERATINOCYTES

BRUMENIL Virginie

Résumé

La déplétion de cholestérol membranaire des kératinocytes épidermiques induit l'apparition d'un phénotype différencié dans ces cellules. Les kératinocytes présentent alors une expression accrue d'involucrine typique des cellules en phase de différenciation tardive. La surexpression d'involucrine observée est induite par l'activation de la voie de signalisation de la MAPK p38. Les protéines kinases C (PKC) ne participent pas à l'induction de la voie des MAPK p38 lors de l'extraction du cholestérol.

Notre étude porte sur l'implication des Rho GTPases dans l'activation de la voie des MAPK p38 lorsque nous déplaçons les kératinocytes en cholestérol. Les Rho GTPases semblent en effet impliquées dans la régulation de l'activation de cette voie. L'inhibition des Rho GTPases par la toxine B de *Clostridium difficile* induit une activation des MAPK p38, comme suggéré dans la littérature. Néanmoins, nous observons que l'augmentation de la concentration en toxine B induit une diminution de la phosphorylation de la MAPK p38. Nous avons ensuite recherché le rôle de la protéine ROCK, un effecteur des Rho GTPases, dans cette même signalisation. Les résultats obtenus nous font penser que la protéine ROCK, en tant qu'effecteur des Rho GTPases, est un intermédiaire dans l'induction de la voie des MAPK p38 et de l'expression d'involucrine.

Des études complémentaires sur l'implication de chaque membre de la famille des Rho GTPases, Rho A, B et C, Rac1 et Cdc42, seront nécessaires pour mieux comprendre l'implication des Rho GTPases dans l'induction des MAPK p38 lors de la déplétion en cholestérol.

Remerciements,

Ces quelques mois passés au sein du département d'Histologie-Embryologie m'ont beaucoup apporté tant au niveau professionnel et pratique qu'au niveau humain.

Je tiens tout d'abord à remercier mon promoteur, Monsieur Yves Poumay pour son accueil, sa grande disponibilité, ses bons conseils et pour m'avoir fait partager sa passion pour les sciences.

Je n'oublie pas non plus de remercier mon co-promoteur, Monsieur Michel Hérin pour ses remarques pertinentes et ses conseils judicieusement donnés au cours de nos petites réunions hebdomadaires.

Je voudrais également dire un tout grand merci à l'équipe du département pour sa bonne humeur et bien sûr pour les conseils très utiles qu'elle m'a apporté tout au long de mon mémoire.

Merci à Françoise Herphelin pour sa grande disponibilité, sa générosité et sa patience face aux nombreuses questions que j'ai pu lui poser.

Merci à Emilie Bera pour sa joie de vivre, sa présence qui fut souvent bien réconfortante dans les moments plus difficiles et pour l'aide fournie à la fin de ce mémoire car quatre mois, cela passe très vite.

Merci aussi à Raphaël Déom et Daniel Van Vlaender pour leur présence, leur patience et la bonne humeur qu'ils mettent au sein du laboratoire.

Merci aussi à tous les autres membres du laboratoire que je n'ai pas cité mais que je n'oublie pas pour autant.

Je voudrais aussi remercier ma maman qui, même si elle n'en était pas consciente, m'a apporté un grand soutien tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Liste des abréviations :

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
APS	Ammonium persulfate
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	Bovine serum albumine
C	Confluence
DEPC	Diéthyl pyrocarbonate
dFCS	Fœtal calf serum dialysé
DMR	Detergent-resistant membrane
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTP	Déoxynucléotide triphosphate
dsg-3	Desmoglénine-3
EDTA	Acide éthylènedinitrilotétraacétique
EGF	Epidermal growth factor
ERK	Extracellular regulated kinase
GAP	GTPase activating proteins
GDI	GDP dissociated inhibitor
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GTP	Guanosine triphosphate
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HMG-CoA	Hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A
HRP	Horse raddish peroxydase
HSP	Heat shock protein
IL	Interleukine
JNK	c-Jun N-terminal kinase
kDa	kiloDalton
KGM	Keratinocyte growth medium
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKAPK	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase
MAPKK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MAPKKK	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MβCD	Méthyl-béta-cyclodextrine
MEK	MAP/ERK kinase
MOPS	Acide 3-morpholino-propanesulfonique
MTT	3-(4,5-diméthylthiazole-2-yl)-2,5-diphényl tetrazolium bromide
NAK	Normal abdominoplasty keratinocyte
OA	Acide okadaïque
PBS	Phosphate buffer saline
PC	Post-confluence
PKC	Protein kinase C
PP2A, 2B	Protein phosphatase 2A, 2B
PVDF	Poly vinylidiène difluoride
SC	Sous-confluence

SDS	Sodium dodecyl sulfate
siRNA	Short interfering RNA
TEMED	N,N,N-tétra-méthyl-éthylènediamine
TNF α	Tumor necrosis factor alpha
TPA	12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate
UV	Ultra violet
UDP	Uridine diphosphate

INTRODUCTION

1.1. INTRODUCTION

1.1.1. Généralités

1.1.1.1. Caractéristiques et fonctions

La peau est l'organe du corps humain le plus étendu et le plus important du point de vue de la taille : un adulte moyen de 75 kg possède une surface de peau d'environ 1.5 à 2 m² et ceci représente une masse d'environ 6 kg. Son épaisseur varie entre 1.5 mm et 4 mm dans certaines zones du corps.

La peau se compose de trois tissus différents par leur composition et leur fonction. On retrouve, de l'intérieur vers l'extérieur, l'hypoderme, le derme et enfin l'épiderme.

Les tissus cutanés tout comme les épithéliums respiratoire, digestif et uro-génital sont des tissus d'une importance capitale puisqu'ils permettent d'isoler les structures internes du milieu extérieur. Leur rôle de barrière est indispensable au maintien de l'intégrité de l'ensemble de l'organisme. Contrairement aux muqueuses citées plus haut, la peau humaine ne se trouve pas baignée dans un milieu aqueux, mais elle se trouve, sur sa face externe, exposée à un milieu sec et hostile. De par cette différence, la peau a pour rôle d'empêcher les pertes de liquide corporel et d'empêcher l'entrée de substances étrangères depuis l'extérieur. Cette capacité de protection est due à la présence d'une couche cornée imperméable en surface de la peau, au sommet de l'épiderme.

Outre cette fonction de barrière, la peau joue d'autres rôles tout aussi importants :

- ☞ **Protection** : la peau joue aussi un rôle de protection face aux agressions externes tant mécaniques, chimiques, thermiques, microbiennes, ...
- ☞ **Thermorégulation** : de par sa fonction d'interface extérieur-intérieur, la peau joue un rôle central dans la thermorégulation. C'est à son niveau que se retrouvent les glandes sudoripares et un réseau vasculaire complexe (Figure 1-1) qui vont permettre de réguler les échanges thermiques avec l'extérieur pour maintenir une température corporelle optimale.
- ☞ **Métabolisme** : c'est au niveau de la peau, grâce à une photoréaction, que se fait la synthèse de vitamine D.
- ☞ **Sensibilité tactile** : la peau est l'endroit où se déploie une gamme très étendue de récepteurs nerveux qui sont responsables du sens du toucher. Il y a des terminaisons libres et encapsulées (Figure 1-1). Il y a également des thermorécepteurs et des nocicepteurs qui permettent l'évaluation de la température et la perception de dangers vis à vis l'intégrité de la peau.

1.1.1.2. Structure histologique de la peau

La peau est constituée de trois couches tissulaires superposées (figure 1-1) :

La couche tout à fait interne est appelée **hypoderme**. Elle est constituée de tissu conjonctif riche en lobules adipeux qui servent de réserve énergétique importante mais aussi à l'absorption des chocs mécaniques et à l'isolation thermique.

Au dessus de l'hypoderme, se trouve le **derme**. Il s'agit d'un tissu conjonctif constitué de fibroblastes, de fibres de collagène et de fibres élastiques qui assurent souplesse et résistance. Dans cette zone se retrouvent aussi les structures annexes de la peau telles que les poils, les glandes sudoripares et sébacées. Cette couche est particulièrement riche en terminaisons nerveuses et en vaisseaux sanguins.

Enfin, la couche supérieure est constituée par l'**épiderme**. C'est un tissu constitué principalement de kératinocytes qui se stratifient en se kératinisant. Ce tissu est séparé du derme par une lame basale qui a pour fonction le soutien et l'adhésion de kératinocytes. L'épiderme n'est pas vascularisé. Il est nourri par diffusion des nutriments depuis le réseau vasculaire du derme.

La surface entre le derme et l'épiderme est fortement accrue grâce à la présence de papilles dermiques qui plongent dans l'épiderme et de crêtes épidermiques qui s'enfoncent dans le derme.

Dans le cadre de ce travail, la couche d'intérêt est l'épiderme.

1.1.2. L'épiderme

1.1.2.1. Structure de l'épiderme

L'épiderme, composé à 95% de kératinocytes, constitue la couche la plus externe de la peau. Il s'agit d'un épithélium stratifié kératinisé qualifié de « type B » (de 75 à 150 μm d'épaisseur) pour la majorité de la surface corporelle. Au niveau de la paume des mains et de la plante des pieds par contre, l'épithélium stratifié kératinisé de « type A », est nettement plus épais (de 600 à 700 μm).

L'épaisseur idéale, qui est fonction de l'endroit du corps, est maintenue grâce d'une part, à une prolifération des kératinocytes de la couche basale qui assure le renouvellement de l'épiderme et d'autre part, à la desquamation des cellules de la couche cornée en surface. Le maintien de taux de prolifération, de différenciation et de kératinisation équilibrés est bien entendu d'une grande importance pour assurer la fonction correcte de l'épiderme (McMullan & al., 2003)

L'épiderme en lui-même peut être subdivisé en de quatre couches cellulaires distinctes (figure 1-2) :

- ☞ **La couche basale :** c'est la couche la plus profonde de l'épiderme qui repose sur la lame basale. Elle est constituée d'une seule assise de cellules cubiques ayant un rapport noyau-cytoplasme élevé. Trois types de kératinocytes se retrouvent à ce niveau : les **cellules souches** qui ont un potentiel prolifératif illimité et qui vont, par mitose, fournir de nouvelles cellules souches et des **cellules amplificatrices transitoires**. Celles-ci prolifèrent très rapidement mais de manière limitée pour former des **cellules filles post-mitotiques** qui vont alors perdre le contact avec la lame basale et entamer leur processus de différenciation en progressant vers les couches supérieures de l'épiderme.
- ☞ **La couche épineuse ou corps muqueux de malpighi :** celle-ci surmonte directement la couche basale. Elle est constituée de plusieurs assises de kératinocytes ayant une forme polyédrique. Ceux-ci présentent une morphologie particulière car ils sont imbriqués les uns dans les autres au travers d'expansions cytomembranaires solidaires par de nombreux desmosomes. Dans les assises épineuses supérieures, les kératinocytes s'aplatissent et des corps d'Odland apparaissent. Ceux-ci contiennent des glycolipides et des phospholipides, avec des enzymes de nature lysosomale.
- ☞ **La couche granuleuse :** elle est la dernière couche de cellules vivantes nucléées de l'épiderme. Les kératinocytes y deviennent pavimenteux, leur membrane s'épaissit en une enveloppe cornée et le cytoplasme se chargeant en granules de sécrétion : les grains de kératohyaline et les corps d'Odland. De plus, les noyaux se pycnosent .
- ☞ **La couche cornée :** il s'agit de la couche fonctionnelle de la peau. Elle est constituée de kératinocytes morts anucléés et dépourvus des organites habituels. Ces cellules appelées cornéocytes présentent un cytosquelette renforcé formé de filaments de kératine et de filaggrine issues des grains de kératohyaline qui se sont dissous dans le cytoplasme. L'espace intercellulaire est rempli du contenu des corps d'Odland qui s'y est déversé. Cela assure l'imperméabilité de la couche cornée. Les cornéocytes les plus superficiels finissent par desquamer. C'est au niveau de la couche cornée qu'il est possible de faire la différence entre les deux types d'épidermes : le type B présente une couche cornée relativement fine, alors que le type A présente une couche cornée épaisse.

Le processus de différenciation de l'épiderme prend environ un mois chez l'être humain.

1.1.2.2. Types cellulaires épidermiques

- ☞ **Les kératinocytes :** les kératinocytes qui rappelons-le forment la majorité de la population cellulaire de l'épiderme se différencient pour former la couche cornée. Au cours de la différenciation terminale il y a consolidation de leur cytosquelette par des filaments de kératine, appelés aussi tonofilaments. Les kératines qui forment les tonofilaments sont des protéines fibreuses en hélice α . Il en existe environ une trentaine répertoriées qui se classent en deux types : I et II qui diffèrent de par leur point isoélectrique : il existe ainsi des kératines basiques et des kératines acides. Ces deux types s'associent pour former des dimères. Une protéine de kératine fait environ

300 acides aminés et est formée d'un domaine central qui se retrouve dans tous les filaments et d'extrémités carboxy et amino terminales propres à chaque type de kératine formant le dimère. Ce dimère est appelé protofilament. Huit protofilaments s'assemblent ensuite pour former un filament intermédiaire.

Dans les kératinocytes se retrouvent principalement quatre kératines différentes : K10 et K14 pour le type acide, et K1 et K5 pour le type basique. La variation dans leur taux d'expression reflète l'état de différenciation de l'épiderme. Les kératines 5 et 14 sont exprimées dans les couches basales tandis que les kératines 1 et 10 le sont dans les couches suprabasales (Moll & al., 1982). Ainsi, lors de la différenciation, le kératinocyte modifie l'expression des gènes codant pour les kératines et cela simultanément pour les deux types de kératines nécessaires.

- ☞ **Les mélanocytes :** le corps de ces cellules se situe au niveau de l'assise basale épidermique (Figure 1-3). Elles envoient de nombreux prolongements entre les kératinocytes des couches supérieures. Les UV ont pour effet d'augmenter la synthèse de mélanine par les mélanocytes. Cette mélanine est stockée dans des organites appelés mélanosomes qui sont ensuite transférés dans le cytoplasme des kératinocytes pour les protéger contre les effets des UV.
- ☞ **Les cellules de Merkel :** ces cellules se retrouvent également au niveau de la couche basale (Figure 1-3). Elles sont en contact avec des terminaisons nerveuses et servent de récepteurs sensoriels.
- ☞ **Les cellules de Langerhans :** ce sont des cellules issues de la moelle osseuse qui se trouvent dans les couches suprabasales vivantes de l'épiderme (Figure 1-3). Ce sont en fait des cellules présentatrices d'antigènes qui jouent un rôle capital dans la réponse immunitaire. Elles capturent les antigènes qu'elles rencontrent au niveau de l'épiderme et migrent ensuite vers les organes lymphoïdes où elles vont présenter ces antigènes aux lymphocytes T.

1.2. LA DIFFÉRENCIATION ÉPIDERMIQUE

En se basant sur l'état physiologique des kératinocytes, nous pouvons aussi subdiviser l'épiderme en deux compartiments distincts : le compartiment de prolifération constitué de l'assise basale et le compartiment de différenciation, comprenant toutes les couches suprabasales où les kératinocytes réalisent leur maturation. La différenciation peut être résumée par la réorganisation d'un kératinocyte basal en une cellule fonctionnelle et rigide, le cornéocyte (Eckert, 1989).

1.2.1. La prolifération des cellules basales

Comme nous l'avons dit précédemment, dans la couche basale (ou compartiment basal), se rencontrent trois types cellulaires : des cellules souches à cycle cellulaire lent et taux de renouvellement illimité, des cellules amplificatrices transitoires issues des premières, à cycle cellulaire rapide et leurs cellules filles des cellules post-mitotiques qui elles vont entamer un processus irréversible de différenciation. La différenciation épidermique commence donc dès ce compartiment basal.

Les cellules de cette couche basale sont caractérisées par l'expression de certaines protéines. Retenons les kératines 5 et 14 ainsi que des molécules d'adhérence de la famille des intégrines qui permettent un ancrage à la lame basale via la laminine 5.

La prolifération des cellules de la couche basale est stimulée par divers facteurs de croissance tels que l'EGF (Epidermal Growth Factor), l'insuline ou la transferrine. Ces facteurs en se liant à des récepteurs propres induisent des cascades de phosphorylation ou déphosphorylation dans les cellules qui vont aboutir à l'expression de gènes caractéristiques soit de la prolifération soit de la différenciation (Pittelkow & al., 1993). Ces facteurs de croissance sont d'ailleurs ajoutés au milieu de culture pour permettre aux kératinocytes de proliférer.

1.2.2. La différenciation des kératinocytes

Une fois que les cellules perdent le contact avec la lame basale, elles entament leur processus de différenciation. On assiste à une modification de l'expression de certains gènes au cours de cette différenciation tels que ceux des kératines 1, 5, 10 et 14, de l'involucrine, plus tardivement et enfin de la filaggrine ou de la lorricrine qui seront introduites plus loin.

Il a été démontré que c'est bien la perte de contact avec la lame basale qui induit l'entrée en différenciation. En effet, la mise en suspension d'une culture cellulaire fait apparaître une augmentation de l'expression de l'involucrine qui est un marqueur de différenciation plutôt tardif et un arrêt de l'expression des intégrines (McMullan & al., 2003).

Au sein du laboratoire, nous utilisons un autre modèle de différenciation des kératinocytes. Il se caractérise une succession de différents stades qui sont la sous-confluence, la confluence et la post-confluence. Le profil d'expression décrit précédemment apparaît également dans ce modèle de culture. Au moment de la confluence, il y a un ralentissement important de la prolifération en faveur de la différenciation (Poumay & Pittelkow, 1995). En effet, le taux de protéines caractéristiques des couches suprabasales augmentent : l'involucrine et la kératine 10, ce qui suggère une stratification. (Poumay & al., 1999)

Introduction

In vivo, la différenciation des kératinocytes se fait au travers de toutes les couches superficielles de l'épiderme et s'entame dès que la cellule perd le contact avec la lame basale (Figure 1-4).

De gros changements caractérisent le passage de la couche granuleuse à la couche cornée. Il y a une perte d'intégrité de la membrane plasmique qui induit une entrée massive de calcium dans la cellule. Cela a pour conséquence la destruction des organelles cellulaires suite à l'activation de protéases et de nucléases. En même temps que cette dégradation intracellulaire, ce phénomène induit l'expression abondante de l'involucrine et des kératines suprabasales. C'est alors que s'entame la différenciation terminale des kératinocytes afin de devenir des cornéocytes (Robinson & al., 1996). Ces cellules se caractérisent par la présence d'une enveloppe cornée formée d'involucrine et de loricrine. La transglutaminase-1 crée des ponts en catalysant la formation de liens esters entre les résidus glutamyl de l'involucrine. La loricrine est également un substrat de la transglutaminase-1 et est incorporée par un mécanisme similaire à la structure de l'enveloppe cornée. Le cytosquelette de kératines est stabilisé, suite à la formation de ponts disulfures, par la filaggrine stockée sous forme de précurseur de profilaggrine dans les grains de kératohyaline (Eckert & al., 2005). C'est également à ce stade que les corps d'Odland interviennent. Ils déversent leur contenu dans l'espace intercellulaire. Cette composante lipidique qui comble les espaces intercellulaires confère à l'épiderme une imperméabilité face à l'environnement extérieur.

En résumé, il y a lors de la différenciation des kératinocytes modification de l'expression de certaines protéines qui peuvent devenir des marqueurs pour évaluer l'état de leur maturation. Les kératines 5 et 14 sont caractéristiques de la couche basale, les kératines 1 et 10 sont elles, exprimées au niveau de la couche épineuse tandis que la profilaggrine, l'involucrine, la loricrine et la transglutaminase-1 sont des marqueurs de différenciation tardive exprimés au niveau de la couche granuleuse.

1.3. CHOLESTÉROL ET KÉRATINOCYTES

1.3.1. Généralités

Le cholestérol est un lipide faisant partie de la famille des stérols. Il sert d'ailleurs de précurseur aux hormones stéroïdiennes. Il s'agit d'une molécule principalement hydrophobe de par sa constitution : un squelette hydrocarboné formé de quatre cycles accolés et d'une courte queue hydrophobe. Néanmoins, un groupement $-OH$ constitue une petite partie hydrophile (figure 1-5).

Le cholestérol est en partie amené dans l'organisme par la consommation de produits d'origine animale tels que le beurre, la viande ou les œufs. Néanmoins, les spécialistes estiment que la plus grande partie du cholestérol de l'organisme est fabriquée par le foie via des voies de synthèse complexes. Il est ensuite acheminé par la circulation sanguine via les lipoprotéines sous forme d'ester de cholestérol jusqu'aux tissus. L'épiderme étant un tissu non vascularisé, il synthétise lui-même le cholestérol dont il a besoin.

1.3.2. Le cholestérol membranaire

Le cholestérol sert notamment de constituant membranaire ayant un rôle structural et de molécule ayant de multiples fonctions au sein de la cellule : métabolisme, adhésion, transduction du signal, apoptose et réponse immunitaire (Simons & Toomre, 2000). Le cholestérol constitue 30 à 40 % de la totalité des lipides membranaires (sphingolipides et phospholipides). Il permet d'ordonner la bicouche lipidique qui, sans lui, serait une « phase liquide désordonnée ». Sa structure rigide contraint les chaînes hydrophobes des phospholipides à s'étirer et permet ainsi de les compacter pour former la bicouche lipidique telle qu'on la connaît : une « phase liquide ordonnée ». Cette fonction du cholestérol contribue à la perméabilité membranaire sans nuire à la mobilité des protéines dans la membrane (Rajendran & Simons, 2005 ; Owicki & McConnell, 1980).

1.3.3. Les « lipid rafts »

L'étude du cholestérol membranaire a mené à la découverte du concept de « lipid rafts » dans les années '90. Il s'agit de microdomaines lipidiques du feuillet externe de la membrane plasmique ayant une composition différente du reste de celle-ci (Schroeder & al., 1994) : ils contiennent une plus grande proportion de cholestérol ainsi que des phospholipides et sphingolipides ayant des chaînes hydrocarbonées saturées contrairement aux lipides retrouvés dans le reste de la membrane (figure 1-6). Il semble qu'une organisation lipidique comparable puisse exister au niveau du feuillet interne de la membrane mais les propriétés de celle-ci ne sont pas encore claires. Les considérations théoriques prédisent seulement qu'une organisation au niveau du feuillet externe mène à une structure également plus organisée au niveau du feuillet interne (Rajendran & Simons, 2005).

Les « lipid rafts » ont d'abord été découverts grâce à leur capacité de résistance aux détergents non ioniques et ont été appelés alors « fractions membranaires résistantes aux détergents » (detergent-resistant membrane fractions : DRM) (Rajendran & Simons, 2005). Ils ont été ensuite démontrés comme ayant de nombreuses fonctions cellulaires surtout

impliquées dans les voies de transduction du signal, dans la prolifération cellulaire et l'apoptose (Pike, 2003). En effet, certains récepteurs tels les récepteurs aux facteurs de croissance, se trouvent associés à ces structures lipidiques. Les « lipid rafts » sont également enrichis en cavéoline, flotilline, protéine kinase C (PKC), protéines G, récepteurs à activité tyrosine-kinase,... (Pike, 2003). Dès lors, cela suggère que les « lipid rafts » jouent un rôle central dans le déclenchement de beaucoup de voies de signalisation cellulaires.

Néanmoins, vu leur petite taille, 100 à 200 nm de diamètre (Pike, 2003), les « lipid rafts » ne sont pas visibles en microscopie optique. Leur visualisation nécessite un marquage de constituants spécifiques de ces microdomaines. L'utilisation de la sous-unité B de la toxine cholérique (CTx-B) couplée à une molécule fluorescente permet de mettre les « lipid rafts » en évidence au microscope à fluorescence car elle se lie aux glycosphingolipides GM1 qui sont utilisés comme marqueurs de ces domaines lipidiques (Bang & al., 2005).

Étant donné leur composition particulière, enrichie en cholestérol, il est possible d'étudier les effets que peut avoir une altération des « lipid rafts » en extrayant le cholestérol membranaire.

1.3.4. L'extraction du cholestérol membranaire par la Méthyl- β cyclodextrine dans les kératinocytes

La méthyl- β -cyclodextrine est un polysaccharide formé de 7 sous-unités de glucose. Cette molécule cyclique est hydrosoluble et capable d'extraire le cholestérol des membranes grâce à la cavité intramoléculaire qu'elle forme (figure 1-7).

La présence de méthyl- β -cyclodextrine dans le milieu de culture des kératinocytes va diminuer la teneur en cholestérol des « lipid rafts » mais également du reste de la membrane plasmique. Notons aussi que le traitement par la M β CD augmente la perméabilité membranaire d'environ 10%, ce qui est le signe d'une légère toxicité (Jans & al., 2004 ; Owicki & McConnell, 1980).

Des études ont montré que l'utilisation seule de la méthyl- β -cyclodextrine (M β CD) à une concentration de 7,5 mM pendant une heure n'est pas suffisante pour maintenir une modification de la composition membranaire en cholestérol après la fin de ce traitement (Thèse de Ralph Jans, 2004). De même, la lovastatine, inhibiteur de la synthèse du cholestérol, seule ne permet pas de faire chuter le taux de cholestérol membranaire de manière significative. Cette molécule fait partie de la famille des statines qui sont des inhibiteurs de l'hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase qui est l'enzyme-clé de la synthèse du cholestérol.

Par contre l'utilisation combinée de ces deux molécules permet une extraction efficace du cholestérol des membranes. La M β CD est utilisée pendant une heure afin d'extraire le cholestérol, et ensuite elle est remplacée par la lovastatine pendant 17 heures, à une concentration de 10 μ M afin qu'il n'y ait pas de néosynthèse de cholestérol par la cellule (Thèse de Ralph Jans, 2004).

Le stade de culture est important à considérer pour détecter les effets de la déplétion en cholestérol. Le modèle de culture utilisé dans cette étude se caractérise par trois stades de densité cellulaire différents (Figure 1-8). La « sous-confluence » est atteinte lorsque les kératinocytes occupent environ 70% de la surface de la boîte de culture. La « confluence » est

définie par une occupation de la totalité de la surface de culture ainsi que par des jonctions intercellulaires peu réfringentes qui traduisent le fait que les cellules sont bien tassées les unes contre les autres. La « post-confluence » est atteinte quatre jours après la confluence.

L'extraction du cholestérol sur des cultures de kératinocytes sous-confluentes ou post-confluentes n'induit pas de modification du taux d'expression de marqueurs de différenciation tels que l'involucrine, K10 et K14. Ce n'est qu'au stade précis de la confluence qu'il est possible d'observer des modifications du niveau d'expression de ces protéines : une augmentation de l'expression d'involucrine et une diminution de celle de K10 et K14. Parallèlement, on peut observer une activation par phosphorylation des MAP kinases p38 et de la « heat shock protein » 27 (Mémoire de Conny Mathay, 2004).

L'observation de ces résultats, suite à plusieurs études au sein du département, suggère que le cholestérol joue un rôle dans la régulation de l'expression de certains marqueurs de différenciation.

Il semble également qu'il existe des similitudes entre le phénotype cellulaire observé suite à la déplétion en cholestérol et celui obtenu suite à un stress tel que le TPA (12-tétradécanoylphorbol-13-acétate), un ester de phorbol, connu pour induire l'entrée en différenciation des kératinocytes (Poumay & al., 1999). Le phénotype induit se caractérise principalement par une expression accrue d'involucrine, par une activation de la voie des MAP kinases p38 et la phosphorylation, MAPK p38 dépendante, de HSP27 (Jans & al., 2004 ; Mémoire de Conny Mathay, 2004). Il est dès lors intéressant d'étudier et de comprendre les voies de signalisation induites par l'extraction du cholestérol et de les mettre en parallèle avec celles induites par un stress cellulaire. L'étude de l'expression et de l'activité de diverses protéines faisant partie de voies de signalisation activées suite à un stress sera l'outil principal de ce travail. Il sera question de la MAP kinase p38, de la « heat shock protein » 27, des Rho GTPases et d'un de leurs effecteurs, ROCK qui sont toutes des protéines ayant un rôle dans les réponses des kératinocytes face à divers types de stress : osmotique, thermique ou rayonnement ultraviolets.

1.4. LES STRESS ÉPIDERMIQUES

1.4.1. Généralités

La peau constituant l'interface principale entre l'organisme et son environnement, il est évident qu'elle est la première à subir les stress en provenance de l'extérieur. Ces stress sont de nature très variée. Notons les stress thermiques, mécaniques, chimiques, osmotiques (Garmyn & al., 2001, Cheng & al., 2002) et aux ultraviolets (Wong & al., 2000).

Face à tout cela, l'épiderme doit engager des réponses adéquates afin de conserver son rôle de barrière et maintenir l'intégrité de l'organisme.

1.4.2. La réponse épidermique face à un stress

Face aux agressions diverses, l'épiderme ne constitue pas seulement une barrière physique et passive. Il s'y initie un grand nombre de processus qui permettront de réagir de manière adéquate au stress perçu. L'épiderme va notamment produire des cytokines ou d'autres molécules qui ont des propriétés inflammatoires, immunologiques ou autres comme l'augmentation de la prolifération (Coquette & al., 2000).

Un grand nombre de ces molécules sont reprises dans le tableau 1-1. Les plus importantes sont : l'interleukine-1 α (IL-1 α), le « Tumor Necrosis Factor α » (TNF α) les cytokines chemotactiques (IL-8, ...), les « Growth Promoting Factor » (IL-6, 7 et 15) et encore beaucoup d'autres.

1.4.3. Les voies de signalisation induites par un stress

Les réponses des kératinocytes lorsqu'ils sont exposés à un stress passent par différentes voies de signalisation enclenchées par le stress lui-même ou par des molécules « de stress » produites par les cellules voisines. Les récepteurs membranaires impliqués dans l'initiation d'une réponse sont souvent des protéines qui vont se dimériser lors de la liaison du ligand et se transphosphoryler. Il s'agit de la première étape dans la transduction du signal. Les protéines suivantes impliquées dans la voie de signalisation sont généralement des protéines kinases. Ces kinases vont alors activer leurs divers effecteurs par l'ajout d'un groupement phosphate sur les sérines, thréonines et tyrosines de ceux-ci.

☞ Un stress hyperosmotique par exemple, va induire une activation de la voie de signalisation des MAP kinases dont p38 et des « heat shock proteins » 27 et 70 (Garmyn & al., 2001). Cette signalisation peut être importante dans les mécanismes de réponse de l'épiderme face aux modifications de l'humidité de l'environnement. Ce type de stress agit sur la cellule aussi via les petites GTPases Rho et la MAP kinase p38 (Cheng & al., 2002).

☞ Le choc thermique induit la phosphorylation de « Heat Shock Proteins » telles que HSP27 qui est très importante en tant que chaperonne pour préserver la fonctionnalité des protéines.

Introduction

☞ Les ultraviolets ont été démontrés comme induisant aussi des protéines de choc thermique telles que HSP27 via la voie des MAP kinases p38 (Wano & al., 2003 et Wong & al., 2000).

L'activation de la MAP kinase p38 semble donc être un élément clé dans la réponse des kératinocytes face à un stress.

1.5. LA MAP KINASE P38

1.5.1. Généralités

Tout stress que subit une cellule induit une cascade de signalisation intracellulaire complexe qui doit mener à une réponse adéquate. Souvent ces voies de signalisation impliquent des MAP kinases (Mitogen Activated Protein Kinase : MAPK). Celles-ci sont connues pour être impliquées dans de nombreuses voies de signalisation telles que la prolifération et la différenciation cellulaire, l'apoptose et bien entendu les réponses au stress.

La voie des MAP kinases se compose d'une série de trois kinases successives. La première kinase, une MAPKKK (MAPK kinase kinase) est activée suite à la phosphorylation d'un récepteur membranaire qui induit l'activation en série de plusieurs protéines cytoplasmiques. Les résidus tyrosine phosphorylés du récepteur vont recruter tout d'abord une protéine adaptatrice Grb2 qui permet le recrutement de la protéine SOS. Cette dernière stimule l'échange du GDP en GTP sur la protéine Ras. Ras peut alors recruter RAF qui sera l'initiateur de la phosphorylation de la voie des MAP kinases. La MAPKKK activée va phosphoryler la kinase se trouvant juste en aval dans la cascade, une MAPKK ou MEK (MAP/ERK kinase). Celle-ci va à son tour phosphoryler une MAPK, la dernière kinase de cette courte voie (Figure 1-9). La MAPK va avoir de nombreuses cibles qui vont à leur tour être phosphorylées et être responsables des réponses de la cellule. Une partie des MAPK activées peut être transloquée dans le noyau et y avoir une action directement sur des facteurs de transcription tels que c-myc, ATF-2 ou Stat1 (Figure 1-10) et ainsi induire la transcription de certains gènes (Hildesheim & al., 2004).

Parmi toutes les kinases de cette voie, il est possible de distinguer trois groupes. Il y a premièrement les ERK (Extracellular signal Regulated Kinase), ensuite les JNK (c-Jun N-terminal Kinase) et enfin les p38 kinases. Lors d'une réponse cellulaire il est difficile d'attribuer les effets à l'une ou l'autre de ces kinases (Caffrey & al., 2000). En effet, ces voies ne sont pas bien distinctes et il existe des interconnexions multiples qui ne sont pas représentées sur la figure 1-9. De par cela et aussi à cause du fait que les stimuli et les réponses sont très divers, l'étude de ces voies est complexe.

1.5.2. La MAP kinase p38

Les MAP kinases p38 (figure 1-11) sont des protéines qui sont activées lors de stress cellulaires et sont en conséquence appelées aussi les stress kinases. Néanmoins, elles jouent aussi un rôle dans beaucoup d'autres réponses cellulaires comme la prolifération, l'apoptose ou encore la différenciation (Efimova & al., 2003 et 2004). Leur activation peut mener notamment à l'expression de facteurs de croissance ou à l'activation des récepteurs de ceux-ci (Cheng & al., 2002) et à l'expression de cytokines telles que le TNF α (Tumor Necrosis Factor α) et l'IL-1 β (Interleukine-1 β) (Pargellis & al., 2002).

Des études sur les MAP kinases p38 ont montré qu'il existait en réalité quatre isoformes de cette protéine, ayant des rôles différents. Il existe une forme α , β , γ et δ de la MAPK p38. Ces quatre isoformes ont une homologie de séquence d'environ 60% et possèdent le même motif de phosphorylation : thréonine-glycine-tyrosine. Au niveau de l'épiderme, il n'existe que trois

de ces isoformes : α , β et δ . Selon l'isoforme activée par la situation ou le stress cellulaire, la réponse varie (Efimova & al., 2003).

1.5.2.1. Les voies d'activation de la MAP kinase p38

L'activation des MAP kinases p38 dans les kératinocytes peut être médiée par de nombreux stimuli extracellulaires tels que les UVB (Wong & al., 2000), un stress hyperosmotique (Cheng & al., 2002), l'acide okadaïque (Efimova & al., 2003), le TPA (12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate) et le LPS (lipopolysaccharide) bactérien (Hippenstiel & al., 2000). La MAP kinase p38 joue aussi un rôle important dans la réponse aux agents mitogènes.

Des études portant sur les kératinocytes ont montré que les protéines kinases C (PKC) pouvaient activer la voie de signalisation de la MAP kinase p38 via la cascade qui inclut Ras, MEKK1 et MEK3/6. Il a été montré par cette étude que la PKC activait uniquement l'isoforme δ de la MAP kinase p38. Les stress appliqués étaient le TPA, l'acide okadaïque et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ces résultats suggèrent que l'isoforme δ de la MAP kinase p38 a un rôle important dans la survie et la mort cellulaire (Efimova & al., 2004).

L'isoforme α semble être activée plutôt par les cytokines proinflammatoires telles que l'IL-1 β , le TNF α , ... La plupart du temps ces stress mènent à la mort cellulaire par apoptose.

Les petites GTPases de la famille de Rho sont également capables d'activer la voie de signalisation de la MAP kinase p38 dans le cadre d'un traitement hyperosmotique au sorbitol. Cette étude suggère que les Rho GTPases régulent l'activité de la MAP kinase p38 de manière négative. Lors de l'utilisation de la toxine B de *Clostridium difficile* qui inhibe ces GTPases, les auteurs observent une activation de la MAPK p38 (Cheng & al., 2002).

1.5.2.2. La MAP kinase p38 et la différenciation des kératinocytes épidermiques

Peu d'études à l'heure actuelle s'intéressent à l'implication de la MAPK p38 dans le processus de différenciation des kératinocytes épidermiques. Néanmoins, une première étude (Eckert & al., 2002) s'est intéressée à l'implication des MAPK p38 dans les phénomènes de survie, de mort et de différenciation des kératinocytes. Il en est ressorti que les MAPK p38 ont un rôle important dans le contrôle de la différenciation et de l'apoptose (Figure 1-12A). Ces résultats ne permettaient cependant pas de déterminer quelle isoforme de la MAPK p38 est impliquée dans ces voies de signalisation.

Par la suite, des résultats d'une étude menée sur la forme δ de la MAPK p38 suggèrent qu'il existe un lien entre cette isoforme de la MAPK p38 et la différenciation des kératinocytes (Efimova & al., 2003). Notamment l'implication de p38 δ dans les mécanismes de différenciation a été investiguée grâce à l'utilisation d'acide okadaïque (OA). Celui-ci agit comme inhibiteur des phosphatases 2A, 1 et 3, ce qui fait pencher la balance « phosphorylation-déphosphorylation » vers la forme active de la MAP kinase, c'est-à-dire la forme phosphorylée. La suite de l'étude a montré que l'accroissement de l'activité de l'isoforme δ provoque une augmentation du niveau de certains facteurs de transcription dont C/EBP et AP-1 qui sont impliqués dans la régulation de la différenciation des kératinocytes.

Ces deux facteurs de transcription vont notamment intervenir au niveau du gène de l'involucrine en augmentant l'activité de son promoteur (Figure1-12B) (Efimova & al., 2003). Ces résultats proposent que l'acide okadaïque active la différenciation des kératinocytes via une voie impliquant la MAPK p38.

1.5.2.3. Cibles potentielles pour la MAP kinase p38

La MAP kinase p38 a de nombreuses cibles cellulaires menant à des réponses tout aussi variées.

Parmi ces effecteurs, il y a des facteurs de transcription, par exemple ATF-2, qui permettent une réponse cellulaire à long terme face à une situation particulière. Mais la MAPK p38 a d'autres cibles qu'elle phosphoryle pour obtenir une réponse plus rapide : c'est la forme phosphorylée de cet effecteur qui aura une nouvelle fonction dans la cellule. Dans ce cas, notons les protéines de choc thermique HSP 27 et 70 qui sont activées par la MAPK p38 lors d'un choc osmotique (Garmyn & al., 2001). HSP27 est activée par les MAPKAPK 2 et 3 qui sont des substrats de la MAP kinase p38 (Wong & al., 2000).

Les études cherchant à mettre en évidence de nouveaux effecteurs de la MAPK p38 sont facilitées par l'existence de plusieurs inhibiteurs spécifiques de certaines isoformes de la MAPK p38. Signalons SB202190 et PD169316 (Calbiochem) qui seront utilisés dans ce travail (Fu & al., 2003 ; Stoll & al., 2003). Ces inhibiteurs appartiennent à la classe des pyridinyl imidazoles et se lient au site de fixation de l'ATP sur la protéine pour en bloquer l'activité kinase.

1.6. LES « HEAT SHOCK PROTEINS »

1.6.1. *Aperçu général*

Les protéines de choc thermique (Heat Shock Proteins) abrégées HSP, ont été découvertes il y a environ 40 ans par Ritossa (1962) qui travaillait sur les drosophiles et sur des conditions d'hyperthermie. Ces protéines interviennent aussi dans d'autres types de stress : UV, osmolarité, ...

Il s'agit de familles de protéines hautement conservées par l'évolution, ce qui traduit leur importance au sein des cellules. On les retrouve depuis les bactéries jusqu'à l'homme.

1.6.1.1. Fonctions

Bien qu'ayant des rôles propres, toutes les HSP ont à voir, de près ou de loin, avec le repliement des protéines. En tant que protéines de choc thermique, elles jouent une fonction primordiale dans la thermotolérance des cellules en participant à la stabilisation des protéines et en empêchant la formation d'agrégats de protéines dénaturées (Figure 1-13) (Rogalla & al., 1999)

Mais dans les conditions normales, elles sont aussi exprimées et jouent alors un rôle de chaperonnes pour permettre le repliement adéquat des protéines. Elles auraient aussi un rôle dans le transport et la dégradation des protéines, dans la formation de vésicules recouvertes de clathrine et dans la stabilisation du cytosquelette d'actine (McLaren & Isseroff, 1994).

1.6.1.2. Classification

Les protéines de choc thermique se classent en cinq grandes familles en fonction de leur poids moléculaire :

- HSP27 (27 kDa)
- HSP60 (60 kDa)
- HSP70 (70 kDa)
- HSP90 (90 kDa)
- HSP110 (110 kDa)

Dans une famille, le poids moléculaire des protéines qui la composent varie autour de ces valeurs. La famille de HSP27 est aussi appelée la famille des petites HSP, les small HSP. Mais les HSP les mieux étudiées jusqu'à présent sont celles des familles de haut poids moléculaire.

1.6.2. *La HSP27*

Il s'agit de la famille des HSP les moins bien conservées. Elle est exprimée de manière constitutive dans les cellules mais son expression peut être augmentée de 10 à 15 fois lors de stress.

Comme les autres HSP, HSP27 est impliquée dans la réponse et la protection des cellules après un stress. Mais apparemment, seules ces petites HSP sont capables d'augmenter la

thermotolérance des cellules lorsqu'elles sont surexprimées. Elles ont encore bien d'autres rôles : interaction avec le cytosquelette d'actine et stabilisation de celui-ci (Pichon & al., 2004), implication dans l'apoptose, ...

1.6.2.1. Son rôle dans la prolifération et la différenciation épidermique

Plusieurs études ont montré que HSP27 était régulée lors de l'arrêt de croissance et dans la différenciation des kératinocytes épidermiques. Il apparaît en effet clairement par des marquages immunohistochimiques de peau humaine qu'il y a une augmentation croissante de la quantité d'HSP27 avec la différenciation. Cela suggère que l'expression d'HSP27 est en corrélation avec la différenciation des kératinocytes (Kindas-Mügge & Trautinger, 1994), mais il existe peu de données quant à son rôle dans ce phénomène.

1.6.2.2. L'activation d'HSP27 et son expression en réponse à un stress

L'activation d'HSP27 se fait par une phosphorylation de celle-ci en trois sites potentiels qui sont les sérines 15, 78 et 82. C'est la sérine 82 qui semble être le site privilégié de phosphorylation, suivi de la sérine 78 et finalement la sérine 15. Il apparaît que c'est la forme phosphorylée d'HSP27 qui la forme active. Cette phosphorylation peut apparaître endéans les quelques minutes qui suivent un stress. L'activation peut se faire notamment via les MAPKAPK 2 et 3 (Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinase) (Larsen & al., 1997). Ces deux protéines sont des sérine/thréonine kinases ayant une homologie de séquence de 70% environ.

Il existe plusieurs isoformes de HSP27 phosphorylées étant donné qu'il y a trois sites potentiels de phosphorylation. Dans les kératinocytes non stressés, c'est la forme non phosphorylée qui prédomine avec un faible taux de l'isoforme mono-phosphorylée. Lors d'un stress, il y a une forte augmentation de la quantité d'isoforme bi- et tri-phosphorylée. Cela suggère encore que c'est bien la forme phosphorylée qui est active dans les cellules (Wong & al., 2000).

Les stress qui induisent la phosphorylation sont nombreux et de nature variée : les stress physiques comme les UVB ou UVC (Wong & al., 2000 ; Wano & al., 2004), les cytokines et les esters de phorbol tel que le TPA (McLaren & Isseroff, 1994).

Le niveau d'expression de la protéine totale se trouve également modifié par une exposition à un stress. Dans les quelques heures qui suivent ce dernier, on voit une augmentation de la quantité de protéine. Il s'agit d'un phénomène plus lent puisqu'il passe par la synthèse d'ARNm et par sa traduction (Wano & al., 2003).

1.6.2.3. Implication d'HSP27 dans les voies de signalisation

HSP27 est notamment impliquée dans les voies de signalisation qui induisent un remodelage du cytosquelette d'actine (Gerthoffer & Gunst, 2001). Dans ce cadre, la régulation d'HSP27 dépend de la voie de signalisation de la MAPK p38 (Figure 1-14).

Introduction

Dans d'autres situations de stress (stress oxydatif), HSP27 est activée afin d'assurer une protection de la conformation correcte des protéines cellulaires. Ici, c'est son rôle de chaperonne qui est sollicité particulièrement. Cette activation d'HSP27 semble passer également par la voie des MAP kinases p38 et les MAPKAPK 2 et 3 (Rogalla & al., 1999).

En ce qui concerne son inactivation par déphosphorylation, il semble que ce soient les phosphatases PP2A (protéine phosphatase 2A) et PP2B (protéine phosphatase 2B) qui interviennent de manière efficace (Cairns & al., 1994)

Il est clair, au vu des études sur HSP27, qu'elle intervient dans de nombreuses voies de signalisation intracellulaires. Dans la majorité des situations, son activation semble dépendante de la voie des MAP kinases p38. Son activation peut bien entendu être la conséquence d'un stress, mais peut également survenir dans des conditions normales. Toutes les cascades qui peuvent mener à l'activation de cette protéine sont encore peu élucidées mais présentent intérêt certain et grandissant.

1.7. LES RHO GTPASES

1.7.1. Aperçu sur les petites GTPases

Les GTPases sont des « interrupteurs » moléculaires qui utilisent un mécanisme biochimique simple dans le but de contrôler des processus cellulaires beaucoup plus complexes. Elles oscillent entre deux états conformationnels différents. Il y a un état actif qui représente la GTPase liée à du GTP. L'autre état est dit inactif parce que la GTPase se trouve alors liée à du GDP et à un facteur inhibiteur GDI (GDP Dissociation Inhibitor). Lorsqu'elle se trouve dans son état actif, la GTPase va reconnaître sa protéine cible et générer ainsi une réponse cellulaire jusqu'à ce que le GTP soit hydrolysé en GDP (Figure 1-15). Ce type de mécanisme est très conservé dans l'évolution et les cellules de mammifère en contiennent des centaines (Etienne-Manneville & Hall, 2002).

La super-famille de Ras comprend en réalité cinq sous-classes de GTPases : Ras, Rho, Rab Arf et Ran. Ces protéines sont d'un grand intérêt puisqu'elles semblent avoir des fonctions centrales dans de nombreux comportements cellulaires. Ras est principalement étudié pour son implication dans le contrôle de la transduction du signal des facteurs de croissance, Rho pour son activité de régulation du cytosquelette d'actine, Rab comme régulateur du trafic intracellulaire, Arf comme régulateur de la formation des vésicules et Ran pour son implication dans le transport nucléaire (Etienne-Manneville & Hall, 2002).

1.7.2. La famille des Rho GTPases

1.7.2.1. Généralités

Le gène de Rho a été identifié en 1985 mais l'intérêt particulier vis-à-vis de cette protéine ne date que de 1992. C'est à cette époque que l'on a entrevu les fonctions que pouvaient avoir ces GTPase dans la cellule.

Les protéines faisant partie de la sous-classe des Rho GTPases ont un poids moléculaire se situant entre 20 et 30 kDa. Ces protéines ont au moins 50% d'homologie entre elles et environ 30% d'homologie avec la grande famille de Ras (Aktories, 1997). Les trois GTPases les plus connues et les mieux étudiées de cette famille sont Rho, Rac et Cdc42 pour leur rôle dans la régulation du cytosquelette d'actine. Mais un intérêt supplémentaire s'est développé pour les Rho GTPases parce qu'il a été remarqué qu'elles avaient d'autres rôles dans la cellule, notamment dans la régulation de nombreuses voies de transduction du signal (Etienne-Manneville & Hall, 2002). Elles participent ainsi à la régulation de la polarité cellulaire, à la transcription de gènes et à la progression du cycle cellulaire.

En ce qui concerne la régulation de leur activité, elle se fait de manière comparable aux autres GTPases. Le facteur inhibiteur est ici appelé plus précisément RhoGDI. Les capacités de Rho à lier et hydrolyser le GTP étant relativement faibles, l'intervention de deux familles de facteurs régulateurs est nécessaire : les protéines GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors) qui favorisent le relarguage du GDP et les GAPs (GTPase Activating proteins) qui activent l'hydrolyse du GTP (Figure 1-15)

1.7.2.2. Les effecteurs de Rho

Les protéines cibles des Rho GTPases ne semblent pas posséder un motif de reconnaissance particulier qui rendrait leur recherche plus aisée via les banques de données. Pour les trois Rho GTPases les mieux connues, plus de 60 cibles ont été identifiées expérimentalement jusqu'à présent. Cela traduit certainement leur importance dans les cellules.

Dans le cadre de la régulation du cytosquelette d'actine, l'effecteur principal de Rho est ROCK, une sérine/thréonine kinase. Elle-même agit au niveau de la chaîne légère de la myosine et permet la formation de faisceaux d'actine et la contractilité (Ishizaki, 2003). ROCK semble aussi jouer un rôle important dans la différenciation des kératinocytes. En effet, des études portant sur son inhibition ou son activation ont montré que lorsque ROCK était inhibé, on assistait à une diminution importante de l'entrée en différenciation des kératinocytes et à une augmentation de leur prolifération (McMullan & al., 2003).

Lors d'un stress hyperosmotique (Sorbitol), les Rho GTPases semblent aussi intervenir dans l'activation de la voie des MAP kinases, dont la MAP kinase p38 dans des cellules HaCaT qui sont des kératinocytes immortalisés (Cheng & al., 2002). Pour explorer la voie de signalisation, l'utilisation de la toxine B de *Clostridium difficile*, qui est un inhibiteur de la famille des Rho GTPases, est un outil important. Dans cet article, les auteurs présentent des résultats montrant qu'un choc hyperosmotique induit une activation du récepteur de l'EGF via les Rho GTPases et les MAP kinases p38. Au vu de ces résultats, il semble que Rho ait également comme cible la voie de la MAP kinase p38 ainsi que la régulation du récepteur de l'EGF.

1.7.2.3. L'inhibition des Rho GTPases par la toxine B de *Clostridium difficile*

L'inhibition des protéines de la famille des Rho GTPases par la toxine B de *Clostridium difficile* se caractérise par le fait qu'elles ne peuvent plus lier leurs effecteurs. Cette toxine a la capacité de transférer la partie glucose de l'UDP-glucose sur la thréonine 37 de Rho et sur la thréonine 35, qui est son équivalent chez Rac et Cdc42 (figures 1-16 et 1-17). Cette modification n'altère pas la capacité des GTPases à être chargées en GTP par les protéines GEF. Elle bloque en réalité la capacité d'hydrolyser le GTP en GDP et la capacité de se lier et d'activer les divers effecteurs. Les GTPases ainsi glycosylées sont séquestrées en membrane et ne peuvent même plus lier l'inhibiteur RhoGDI.

L'inhibition de la fonction des Rho GTPases a bien entendu de nombreuses répercussions sur les fonctions cellulaires et les voies de signalisation sous-jacentes. Par exemple, il y a des effets au niveau de la régulation du cytosquelette d'actine, au niveau de la différenciation et de la prolifération des kératinocytes (McMullan & al., 2003).

1.8. LES OBJECTIFS DU TRAVAIL

L'épiderme est le tissu assurant la protection de l'organisme vis-à-vis de son environnement. Son homéostasie est d'une importance capitale afin qu'il puisse assurer sa fonction correctement. Les mécanismes régulant la prolifération, la différenciation des kératinocytes sont donc importants à étudier et à comprendre. Ces études pourraient aboutir à des traitements de certaines maladies épidermiques.

Dans ce mémoire, nous allons continuer la recherche des mécanismes par lesquels une extraction du cholestérol de la membrane modifie le programme de différenciation épidermique des kératinocytes. Nous utilisons un traitement par la méthyl-beta-cyclodextrine qui extrait le cholestérol des membranes afin d'étudier les mécanismes conduisant à l'entrée en différenciation des kératinocytes. En effet, dans le cadre d'un tel traitement, les cellules augmentent l'expression d'involucrine, un marqueur de différenciation tardif. Au niveau protéique, nous nous intéresserons à l'activation de la MAP kinase p38 et d'HSP27 lors de la déplétion en cholestérol et à leur implication dans les voies de signalisation induites par ce traitement.

Par la suite, nous allons chercher à savoir quels peuvent être les effecteurs se trouvant en amont de la voie de signalisation de la MAPK p38 et d'HSP27 et déclenchant cette dernière dans le contexte de la déplétion en cholestérol. L'attention se portera sur les Rho GTPases parce que la littérature nous a suggéré leur importance dans de nombreuses voies de signalisation. Notamment, nous savons qu'elles peuvent agir sur la voie de la MAPK p38 dans le cadre d'un stress hyperosmotique au sorbitol. Nous allons tenter de voir dans quelle mesure elles interviennent aussi sur la voie de la MAPK p38 lors d'une extraction de cholestérol. À la suite de l'étude de l'implication des Rho GTPases, nous nous intéresserons à un effecteur de celles-ci, ROCK, dont l'implication dans l'induction de la différenciation des kératinocytes passant par la voie de la MAPK p38 a été démontrée par McMullan & al., 2003. Nous chercherons ainsi à savoir si ROCK est un intermédiaire de la voie activée par la déplétion en cholestérol.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. LA CULTURE CELLULAIRE

2.1.1. Culture des kératinocytes épidermiques humains

2.1.1.1. Matériel

Milieu complet KGM-2 (Keratinocyte Growth Medium)

- KBM-2 (keratinocyte Basal Medium) (Clonetics, Cambrex)
- Suppléments :
 - BPE (Bovine Pituitary Extract) à 0.2%
 - Hydrocortisone 5×10^{-7} M
 - EGF (Epidermal Growth Factor) 0.2 ng/ml
 - Insuline 5 µg/ml
 - Transferrine 5 µg/ml
 - Epinéphrine
 - Pénicilline 50 unités/ml
 - Streptomycine 50 µg/ml

Milieu complet Epilife +

- Epilife medium (Cascade)
- Suppléments :
 - BPE à 0.2%
 - EGF 0.2 g/ml
 - Insuline 5 µg/ml
 - Hydrocortisone 5×10^{-7} M
 - Transferrine 5 µg/ml
 - Pénicilline G 50 unités/ml
 - Streptomycine 50 µg/ml

Milieu « autocrine » Epilife –

- Epilife medium (Cascade)
- Suppléments :
 - L-histidine 2.4×10^{-4} M
 - L-isoleucine 7.5×10^{-4} M
 - L-méthionine 9×10^{-4} M
 - L-phénylalanine 9×10^{-4} M
 - L-tryptophane 4.5×10^{-4} M
 - L-tyrosine 7.5×10^{-4} M
 - Hydrocortisone 5×10^{-7} M
 - Pénicilline G 50 unités/ml
 - Streptomycine 50 µg/ml

Solution A

- Glucose 10 mM
- KCl 3 mM
- NaCl 130 mM
- Na_2HPO_4 1 mM
- Rouge phénol 0.0033 mM
- HEPES 30 mM
- pH 7.4
- stérilisation par filtration sur Stérivex-GP 0.22 µm

Trypsine T17

- Solution A
- Trypsine à 0.17%

Trypsine T25

- Solution A
- Trypsine à 0.025%
- Ethylène Diamine Tétra-Acétate (EDTA) 0.01%

Solution dFCS 2% (solution bloquante)

- Solution A
- Sérum de veau fœtal dialysé (dFCS) 2%

Milieu de congélation

- Milieu complet Epilife + 80%
- Diméthylsulfoxyde (DMSO) 10%
- dFCS 10%

2.1.1.2. Méthode

Culture Primaire

Les cultures primaires sont réalisées à partir de prélèvements chirurgicaux de peau obtenus lors d'abdominoplasties. Immédiatement après l'intervention, la couche superficielle du prélèvement est récupérée au dermatome (derme et épiderme) et placée dans du liquide physiologique. Les kératinocytes de ces morceaux de peau sont isolés et constituent dès lors une nouvelle souche de kératinocytes : NAK pour Normal Abdominoplasty Keratinocyte. Toutes ces manipulations se font sous hotte à flux laminaire, en conditions stériles.

Toutes les étapes d'isolement des cellules épidermiques se font sur glace avec du matériel stérile et en portant des gants. Les morceaux de peau sont déposés sur une solution de trypsine T17 contenant 0.25 µg/ml de fungizone et 50 µg/ml de gentamycine et découpés en carrés

d'un centimètre de côté. Les prélèvements sont incubés dans un frigo toute la nuit à 4°C et le lendemain, l'épiderme est délicatement détaché du derme et placé dans du milieu KGM-2 avec 2% de Foetal Calf Serum dialysé (dFCS) qui va neutraliser l'action de la trypsine. Les morceaux d'épiderme sont triturés à l'aide de pinces et passés plusieurs fois dans une pipette afin d'en dissocier les cellules. Le tout est ensuite passé sur un filtre de 70µm qui ne laisse passer que les cellules isolées et retient les amas de cellules et notamment les fragments de couche cornée. Le filtrat est ensuite centrifugé 5 minutes à 1000 rpm, à froid. Le surnageant est éliminé et les cellules contenues dans le culot sont remises en suspension dans du milieu complet KGM-2. Les cellules sont alors comptées afin d'estimer leur densité et de pouvoir les ensemercer environ à 46000 cellules par cm² dans des boîtes de cultures T175 dans du milieu complet avec 0.1% de dFCS, de la gentamycine, de l'ampicilline et de la fungizone. La culture est ensuite placée dans une étuve à 37°C, avec une atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Le milieu est changé 3 jours plus tard et ensuite, tous les 2 jours.

Culture secondaire

Cette culture a pour but d'amplifier les kératinocytes suite à la culture primaire. Afin de préserver le pouvoir prolifératif des cellules, il est important que la culture n'atteigne pas le stade de confluence. Pendant la phase de prolifération, les cellules sont détachées avec de la trypsine T25. La culture est d'abord incubée 5 minutes avec cette solution afin de détacher les fibroblastes et les mélanocytes qui ne nous intéressent pas. Ensuite, la trypsinisation est poursuivie pendant 10 à 25 minutes jusqu'à ce que les kératinocytes se détachent du substrat. À ce moment, l'action de la trypsine doit être stoppée par la solution bloquante. Le milieu avec les cellules en suspension est récupéré et centrifugé 5 minutes à 1000 rpm, à 4°C. Le surnageant est éliminé et les cellules sont resuspendues dans du milieu complet Epilife avec une faible concentration en calcium (0.06 mM) pour favoriser la prolifération. Les cellules ont à nouveau comptées et réensemencées à une densité de 7000 cellules par cm². Cette culture secondaire est amenée suffisamment loin pour obtenir beaucoup de cellules, mais arrêtée avant la confluence.

Ce sont des kératinocytes de ces cultures qui vont être congelés pour fournir les cellules utilisées plus tard pour les expériences. Comme précédemment, les cellules sont trypsinisées, centrifugées et comptées. Elles sont ensuite resuspendues dans du milieu KGM-2 de manière à obtenir une densité de cellules double de celle voulue en final. Une quantité équivalente de milieu de congélation deux fois concentré (20% DMSO, 20% dFCS, 60% milieu complet) est ajoutée afin d'obtenir une concentration finale de 1 ou 2 millions de cellules par ml. Cette suspension est répartie dans des cryotubes de 1ml qui sont placés à -80°C pendant une nuit minimum avant d'être transférés dans l'azote liquide à -180°C.

Culture tertiaire

Elle se réalise à partir des cultures secondaires congelées. Le nombre de cryotubes nécessaires est prélevé dans l'azote liquide et ces tubes sont placés dans un bain à 37°C pour une décongélation rapide. Le contenu des tubes est rassemblé dans un tube stérile, placé sur glace, et un comptage est effectué. Les cellules sont généralement ensemençées à une densité de 6000 à 10000 cellules par cm² dans du milieu complet KGM-2. Le lendemain, le milieu est remplacé par du milieu complet Epilife + afin d'éliminer toute trace de DMSO qui est toxique pour les cellules. Le milieu est ensuite renouvelé tous les deux jours.

Une fois arrivés à un recouvrement de 50% environ de la boîte, les kératinocytes de la culture sont rincés deux fois avec de la solution A et incubés dans du milieu autocrine Epilife -. Ce milieu est également changé tous les deux jours.

2.2. TRAITEMENTS DES KÉRATINOCYTES

2.2.1. Inhibition de la MAP kinase p38

Dans le but d'investiguer l'implication de la MAP kinase p38 dans les voies de signalisation, des inhibiteurs de cette kinase sont des outils pharmacologiques importants. Dans ce travail, deux inhibiteurs ont été utilisés : SB202190 et PD169316 (Calbiochem). Ce sont toutes deux des molécules de la famille des pyridinyl imidazoles (Figure 2-1) et inhibiteurs des isoformes α et β de p38 (Garmyn & al., 2001, Stoll & al., 2003)

Du point de vue des manipulations, les inhibiteurs sont ajoutés au milieu de culture à une concentration de 10 μ M pour le SB202190 et de 15 μ M pour le PD169316. Si les cellules doivent subir un autre traitement en complément de celui-ci, l'inhibiteur est ajouté 30 minutes avant le début de ce second traitement. Pour obtenir les cellules contrôles, il faut ajouter dans le milieu de culture, en fonction des dilutions des inhibiteurs, une quantité équivalente de DMSO, étant donné que les deux inhibiteurs sont dissous dans du DMSO. Les cultures sont alors incubées à 37°C pendant le temps voulu.

2.2.2. Extraction du cholestérol membranaire par la méthyl-beta-cyclodextrine

Pour étudier l'extraction du cholestérol, les cultures sont menées jusqu'au stade de confluence. Le traitement se fait alors avec une solution de M β CD à 7.5 mM qui est préparée extemporanément. La quantité adéquate de M β CD (Sigma-Aldrich) est pesée et dissoute dans du milieu « autocrine » Epilife -. Ensuite une filtration au travers d'un filtre 0.22 μ m (Millex-GP, Millipore) permet de rendre la solution stérile. Le milieu des kératinocytes est remplacé par ce milieu contenant la M β CD, pendant 1 heure maximum.

Pour maintenir la déplétion en cholestérol, il faut ôter le milieu contenant la M β CD, rincer deux fois les cultures avec de la solution A, puis inhiber la synthèse endogène de cholestérol grâce à du milieu autocrine Epilife - contenant 10 μ M de Lovastatine (Sigma-Aldrich) qui inhibe l'HMG-CoA réductase. À la fin de ce traitement, les cultures sont encore rincées deux fois à la solution A, analysées tout de suite ou éventuellement congelées à -80°C pour être analysées ultérieurement.

Notons que dans ce traitement aussi, la Lovastatine étant dissoute dans du DMSO, le milieu des cellules contrôles doit aussi contenir du DMSO.

2.2.3. Inhibition des Rho GTPases par la toxine B de *Clostridium difficile*

La toxine B de *Clostridium difficile* permet d'étudier l'implication des Rho GTPases dans les voies de transduction du signal. Elle nous a été généreusement donnée par le professeur Klaus Aktories (Université de Freiburg, Allemagne)

Les cultures sont cultivées jusqu'au stade voulu et ensuite, le milieu est remplacé par du milieu autocrine Epilife - contenant la concentration voulue en toxine B. Dans ce travail,

plusieurs concentrations sont utilisées : 5, 10, 50 et 100 ng/ml. La solution stock utilisée se trouve à une concentration de 200 ng/μl. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C pendant le temps nécessaire.

2.2.4. Inhibition de ROCK par la molécule Y-27632

Cet inhibiteur bloque l'activité de la protéine ROCK (Figure 2-1). Son utilisation permet d'étudier l'implication de cette protéine dans diverses voies de signalisation.

Les cultures sont menées jusqu'au stade désiré. Le milieu est alors remplacé par du milieu autocrine contenant l'inhibiteur à une certaine concentration. Lors de ce travail, quatre concentrations ont été utilisées : 1, 5, 10 et 20 μM. Les dilutions sont réalisées à partir d'une solution stock à 10mM. Après le temps de traitement, les cultures sont rincées deux fois avec de la solution A avant leur analyse.

2.2.5. Choc hyperosmotique au sorbitol

Dans le cadre de ce travail, un traitement au sorbitol a été réalisé afin de créer un stress hyperosmotique pour les kératinocytes. La solution de sorbitol est préparée à partir de Sorbitol (Sigma) qui sera dissout dans du milieu autocrine Epilife. Le sorbitol doit se trouver à une concentration de 600 mosmoles. L'osmolarité d'une solution est le nombre de particules dissoutes dans cette solution. Une solution de 1 osmole correspond à 6.023×10^{23} (le nombre d'avogadro) particules dissoutes. Le sorbitol étant un sucre qui ne se dissocie pas en solution, une mole correspond à une osmole. À partir de ces constatations, une solution de 600 mM est réalisée puis est filtrée stérilement sur un filtre Millex-GP (Millipore).

Le traitement est réalisé par le remplacement du milieu de culture par la solution de sorbitol stérile. Le traitement ne dure que 10 minutes pour éviter les effets toxiques. Après, les cultures sont rincées deux fois à la solution A avant d'être analysées ou congelées à -80°C.

2.3. TEST MTT

Le test MTT a pour but d'évaluer la viabilité cellulaire. Dans le cadre de ce projet, il sert à établir la toxicité d'une molécule ou, au contraire, à en estimer le « rôle protecteur » potentiel vis-à-vis d'un stress.

Ce test se base sur une réaction d'oxydo-réduction accomplie par la succinate déshydrogénase qui se trouve au niveau des mitochondries. En effet, les cellules ayant une activité mitochondriale intacte, c'est-à-dire les cellules vivantes, vont métaboliser le MTT (3-(4,5-diméthylthiazole-2-yl)-2,5-diphényl tetrazolium bromide) en formazan (Figure 2-2). Cette dernière substance est de couleur bleue et est insoluble dans l'eau. Elle précipite donc à l'intérieur des cellules dont on peut ensuite l'extraire pour mesurer sa concentration au colorimètre.

Au niveau des manipulations, une solution de MTT (Sigma) est préparée à raison de 0.5 mg de MTT par ml de milieu. Cette molécule se présente sous forme d'une poudre jaune qu'il faut dissoudre à l'aide du vortex. La solution est ensuite filtrée sur un filtre Millex-GP 0.22µm (Millipore) afin d'éliminer les particules non dissoutes. Le milieu des cellules, cultivées dans des plaques 12 puits en triplicat, est retiré et remplacé par la solution de MTT. L'incubation de 1 heure à 37°C doit se dérouler dans le noir. Après cette incubation, le milieu est retiré complètement des puits et remplacé par de l'isopropanol qui va lyser les cellules et dissoudre le formazan. Les plaques 12 puits sont mises sur un plateau basculant pendant 30 minutes. Ensuite, 100µl de formazan dissout est déposé dans 100µl d'isopropanol, sur une plaque 96 puits. Il faut réaliser un duplicat pour chaque puits de départ. La densité optique est alors mesurée entre 550 et 570 nm (BioRad, Ultramark imaging system). La valeur obtenue est d'autant plus élevée que les cellules ont une bonne viabilité. Ainsi, une perte de viabilité suite à un traitement se traduit par une coloration bleue plus faible et donc une densité optique réduite.

2.4. ANALYSE DES PROTÉINES PAR WESTERN BLOT

2.4.1. Matériel

Tampon de lyse (Sample Buffer 2X)

- Tris-HCl 62.5 mM
- SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) 2%
- Glycérol 8.7%
- Bleu de bromophénol 0.05%
- DTT (DL-Dithiothreitol, Sigma) 0.2M

Running Gel

- Tris base 375 mM à pH 8.8
- SDS 0.1%
- Acrylamide/Bisacrylamide 10%
- APS (Ammonium persulfate) 0.05%
- TEMED 0.1%

Stacking Gel

- Tris base 125mM à pH 6.8
- SDS 0.1%
- Acrylamide/Bisacrylamide 4%
- APS 0.05%
- TEMED 0.1%

Tampon d'électrophorèse

- Tris base 25 mM
- Glycine 192 mM
- SDS 0.1%

Tampon de transfert

- Tris base 25 mM
- Glycine 192 mM
- Méthanol 20%

Solution de rinçage

- 0.1% Tween-20
- NaCl 137 mM
- Na₂HPO₄ + 2 H₂O 8 mM
- KCl 2.7 mM
- KH₂PO₄ 1.5mM

Solution de saturation

- Solution de rinçage
- Lait Gloria Nestlé 5%

2.4.2. Méthode

2.4.2.1. Extraction des protéines

Les cellules sont lysées grâce au tampon de lyse concentré deux fois à raison de 7,1 µl par cm². Le contenu de la boîte est rassemblé et transféré dans un eppendorf spécifique pour chaque condition de test. Les échantillons sont ensuite mis à bouillir 5 minutes et centrifugés à 4°C à 10000 rpm pendant 5 minutes. La centrifugation fait sédimenter les débris cellulaires, alors que les protéines solubles se trouvent en suspension. Le contenu de l'eppendorf, sauf le culot, est transféré dans un nouveau tube qui peut être conservé à -20°C.

2.4.2.2. Electrophorèse et transfert

Suite à un dosage colorimétrique des protéines, la quantité adéquate de protéines est prélevée dans les eppendorfs qui ont été congelés précédemment et est déposée dans un nouveau tube. Le volume de tous les échantillons est amené à une même valeur avec du tampon de lyse 1X. Ensuite, il faut ajouter 10% de ce volume en colorant. Les échantillons sont alors mis à bouillir 5 minutes pour bien dénaturer les protéines. Ils sont ensuite centrifugés quelques instants pour rassembler le liquide à prélever dans le fond du tube.

Les échantillons sont chargés sur un gel de polyacrylamide coulé dans le dispositif adéquat (BioRad). Le pourcentage du gel va dépendre du poids moléculaire de la protéine que l'on veut mettre en évidence. Si celle-ci est de faible poids-moléculaire (environ de 35 kDa) nous utiliserons un gel de 12,5% qui permettra à ces petites protéines de bien s'étaler sur la longueur du gel, retenant les grosses protéines qui auront plus de difficultés à se mouvoir dans

le maillage dense de ce gel. Au contraire si c'est une grosse protéine qui nous intéresse, on choisira un maillage de gel plus large (7,5% à 10%). L'électrophorèse se fait en conditions dénaturantes, c'est-à-dire en présence de SDS (Sodium Docéyl Sulfate) qui va se lier aux protéines et les déplier à cause de la répulsion des charges négatives portées par le SDS. Celui-ci permet aussi de charger les protéines négativement afin qu'elles migrent vers le pôle positif du montage d'électrophorèse. La séparation des protéines dans le gel se fait en fonction de leurs poids moléculaires qui peuvent être révélés grâce à un ladder de poids moléculaire (Prestained SDS-page. Standard Broad Range, BioRad) qui migre simultanément sur une autre piste du gel.

Cette électrophorèse se fait sous une tension de 150 volts, jusqu'à ce que le front de migration parvienne pratiquement au bout du gel.

L'étape suivante est le transfert en immersion des protéines du gel vers une membrane Hybond-P PVDF (polyvinylidenedifluoride) 0.45 μm (Amersham) grâce à l'appareillage de BioRad. Ce transfert se fait durant la nuit dans un frigo, sous une tension de 60 volts en immersion dans du tampon de transfert. Après le transfert, la membrane est récupérée et maintenue humide soit dans du cellophane ou directement dans du tampon de rinçage pour être analysée immédiatement.

2.4.2.3. Révélation de la membrane

La membrane est placée, la face portant les protéines au dessus, dans un bac contenant un peu de solution de rinçage. Après quelques minutes de rinçage, le tampon est remplacé par la solution de saturation pendant 1 heure. Cette manipulation sert à saturer les sites de la membrane qui n'ont pas encore lié de protéines. Ensuite, cette solution est remplacée par de la solution de saturation contenant l'anticorps primaire à la dilution préconisée (Tableau 2-1). La durée de l'incubation avec l'anticorps primaire peut varier de 1 heure à 3 heures selon l'anticorps utilisé et leurs recommandations d'utilisation. Après, la membrane est lavée trois fois 10 minutes avec la solution de rinçage.

La membrane est ensuite incubée dans la solution de saturation contenant la dilution voulue (tableau 2-1) d'anticorps secondaire couplé à la HRP (Horse Raddish Peroxydase) pendant environ 1 heure. La membrane est finalement rincée trois fois 10 minutes avec de la solution de rinçage.

La révélation de la protéine d'intérêt, localisée par les anticorps, se fait par une réaction de chémoluminescence (BM Chemoluminescence Blotting Substrate, Roche). Le substrat de la HRP est mis en présence de celle-ci pendant une minute. Ensuite, la membrane est placée en présence d'un film photographique « hyperfilmTm ECL » (Amersham). Après un temps d'exposition adéquat, le film est développé.

2.5. ANALYSE DES ARN MESSAGERS POLY-A PAR NORTHERN BLOT

Avant toute manipulation d'ARN, il faut s'assurer que l'on travaille bien en condition « RNase-free » afin de prévenir la dégradation des ARN. Cela implique le port de gants pour éviter de contaminer l'ARN avec les ARNases présentes sur la peau. Les solutions utilisées doivent aussi être exemptes d'ARNases : elles sont traitées avec 0.1% de DEPC (diéthyl pyrocarbonate) pendant une nuit. Ensuite elles sont autoclavées pour détruire le DEPC. Tout le reste du matériel doit également être traité au DEPC et être autoclavé avant utilisation.

2.5.1. Extraction des ARNm poly-A

La cellule contient plusieurs types d'ARN : messagers, ribosomiaux et de transfert. Pour pouvoir isoler les ARN messagers, on utilise leur caractéristique qui est de posséder dans leur grande majorité une queue poly-A. Cette succession d'adénines est complémentaire d'un oligonucléotide constitué de thymines (polyT) qui permettra de capturer spécifiquement ces ARN messagers.

2.5.1.1. Matériel

H2O DEPC

- 500ml H₂O
- traitée avec 0.1% DEPC et autoclavée

Tampon riche en sels (High Salt Buffer)

- Tris-HCl 0.01 M
- NaCl 0.5 M
- EDTA 0.001 M
- SDS 0.2%
- Traité avec 0.1% DEPC et autoclavé

Tampon pauvre en sels (Low Salt Buffer)

- Tris-HCl 0.01 M
- NaCl 0.1 M
- EDTA 0.001 M
- SDS 0.2%
- Traité avec 0.1% DEPC et autoclavé

Tampon sans sels (No Salt Buffer)

- Tris-HCl 0.005 M
- EDTA 0.001 M
- SDS 0.2%
- Traité avec 0.1% DEPC et autoclavé

Tampon de lyse

- Tris-HCl 0.01 M
- NaCl 0.1 M
- EDTA 0.0002 M
- SDS 1%
- Traité avec 0.1% DEPC et autoclavé

Tampon TE

- Tris base 9 mM
- EDTA-2H₂O 0.9 mM
- pH 8

2.5.1.2. Méthode

Préparation des oligo-dT couplés à la cellulose

Les oligo-dT sont des chaînes monobrin constituées de 30 déoxythymines. Cet oligonucléotide est complémentaire de la queue poly-A des ARN messagers et permet ainsi de les isoler du reste du « pool » d'ARN de la cellule. A l'extrémité 5'-phosphate, la chaîne de déoxythymines est liée de manière covalente à de la cellulose (oligo-dT cellulose, Invitrogen). Étant donné qu'il faut travailler en condition « RNase-free », les oligo-dT doivent subir des traitements préalables avec du DEPC. La quantité nécessaire d'oligo-dT (0.025g pour une boîte de 75cm² et 0.05g pour une boîte de 175cm²) est pesée pour est lavée deux fois avec

50ml de NaOH 0.1M afin d'enlever les fines particules de cellulose, puis une fois avec de l'eau ultra pure. Entre chaque lavage, on procède à une centrifugation de 1 minute à 1200 rpm. Les oligo-dT sont lavés 15 minutes avec de l'eau ultra pure contenant 0.1% de DEPC. Ensuite, les oligo-dT sont lavés trois fois avec de l'eau DEPC traitée.

Pour mettre les oligo-dT dans les bonnes conditions de salinité pour la liaison aux ARN messagers, ils sont lavés avec du tampon riche en sels. Enfin, les oligo-dT sont remis en suspension dans du tampon riche en sels : 2ml de tampon par boîte de culture à extraire. Ils peuvent être conservés une semaine au frigo, à 4°C.

Extraction des ARN messagers proprement dite

Le milieu des cellules est aspiré avec une pipette pasteur « RNase-free » et est rapidement remplacé par du tampon de lyse contenant une concentration en protéinase K (Roche) de 25 µg/ml. Cette protéase non spécifique va inactiver les RNases et ADNases endogènes. Le lysat cellulaire visqueux est récupéré et déposé dans un tube stérile. Il est ensuite passé 6 fois dans une seringue munie d'une aiguille 21G afin de le fluidifier. La concentration en protéinase K est ajustée à 75 µg/ml avant de mettre le tout incubé 30 minutes à 37°C. Après cette incubation, il faut ajuster la concentration en sels avec du NaCl 5M jusqu'à obtenir une concentration de 0.5M afin que l'appariement des deux oligonucléotides complémentaires puisse se faire. On ajoute alors 2ml d'oligo-dT préparés tel que décrit plus haut à chaque tube de lysat cellulaire. Il faut agiter doucement pendant un minimum de 2 heures à température ambiante pour que l'appariement puisse se faire.

L'étape suivante est l'élution des ARN messagers couplés à la cellulose pour ne récupérer finalement que les ARN messagers.

Les échantillons sont centrifugés 1 minute à 1200 rpm et le surnageant est enlevé avec une pipette pour ne garder que le culot contenant les complexes ARN-cellulose. Celui-ci est resuspendu dans 10ml de tampon riche en sels et lavé deux fois avec ce même tampon. Ensuite les 10ml sont déposés sur une colonne comportant un filtre en silice qui retient la cellulose. Le tube est rincé avec 10ml de tampon riche en sels. Une fois la colonne vide, elle est rincée avec 5ml de tampon riche en sels. Ensuite, la colonne est lavée avec 5 ml de tampon pauvre en sels dans le but de détacher les molécules qui sont liées de manière aspécifique aux oligo-dT. Enfin, pour récupérer les ARN messagers, il faut se mettre dans des conditions de température élevée (55°C) et de salinité très faible. 1,5ml de tampon sans sels chauffé à 55°C est déposé sur la colonne dans ce but. À cette température et à cette salinité, les ponts hydrogène entre les bases se dissocient et libèrent alors les ARN messagers qui s'écoulent dans le tube placé sous la colonne. Pour terminer, il faut ajuster la concentration en sels de l'éluat à 0.5M et lui ajouter deux volumes d'éthanol à 95% froid pour précipiter les ARNm. Les tubes sont placés à -20°C une nuit.

Le lendemain, les ARN messagers sont concentrés grâce à des centrifugations successives de 15 minutes à 12000 rpm, à froid. Le culot est ensuite séché délicatement pour enlever l'éthanol. Le culot est resuspendu dans 25 µl de tampon TE contenant de la protéinase K (1µl par ml). Une dilution 35X de chaque échantillon est faite afin d'en mesurer la densité optique à 260nm pour calculer la concentration et à 280nm pour évaluer la contamination en protéine éventuelle. Les ARNm sont ensuite stockés à -80°C.

2.5.2. Electrophorèse et transfert sur membrane

2.5.2.1. Matériel

MOPS 10X

- 3-(Nmorpholino)-propane sulfonic acid (MOPS) 0.2M
- Acétate de sodium 50 mM
- EDTA 10 mM

Solution tamponnée

- MOPS 0.2 M
- Acétate de sodium trihydraté
- EDTA 10 mM
- pH 7

Gel d'électrophorèse

- Agarose pure à 1.2% (Gibco-BRL) dans de l'eau DEPC traitée.
- MOPS 1X
- Formaldéhyde 6.5%

Formamide désionisée

Désionisation par incubation de 1g de « Mixed Bed Resin (AG-501-X8), BioRad) avec 100ml de formamide (Merck) pendant 4 heures suivi d'une filtration

Sample Buffer

- Formamide désionisée
- Formaldéhyde à 6.5%
- MOPS 1X

Tampon d'électrophorèse

- MOPS 1X
- Formaldéhyde 3.3%

20XSSC

- NaCl 2.9 M
- Citrate de sodium 0.29 M

ARN ladder (0.24-9.5 kb, Gibco-BRL)

Sample Loading Buffer

- 50% glycérol
- 1mM Na₂ EDTA
- 0.4% Xylene cyanol
- 0.4% Bromophénol blue

2.5.2.2. Méthode

À partir des concentrations obtenues précédemment, il faut calculer la quantité d'ARN poly-A à prélever pour déposer 2µg sur le gel. Ces volumes sont déposés dans des tubes eppendorfs respectifs et déshydratés au Speedvac (compter environ 1 minute par µl). Les culots sont resuspendus dans 20µl de « Sample Buffer » qui contient de la formamide et de la formaldéhyde qui détruisent les structures secondaires de l'ARN. Les échantillons sont incubés dans ce tampon 15 minutes à 65°C. Après cette première incubation, les échantillons sont vortexés légèrement et remis à incuber 20 minutes en même temps que 6µl de ladder ARN resuspendu dans 14 µl de « sample buffer ». Dès que les échantillons sortent du bain-marie, ils doivent être placés sur glace pour éviter tout réappariement. On ajoute alors le « Sample Loading Buffer » (2µl) à tous les tubes ainsi qu'1µl de bromure d'éthidium au ladder. Avant de déposer les échantillons sur le gel d'électrophorèse, celui-ci est polarisé 10 minutes sous une tension de 75 volts. Après, les échantillons sont déposés et la migration se fait durant 3 heures à 75 volts. Quand la migration est terminée, le gel est pris en photo sur un transilluminateur sous rayonnement UV, ce qui met en évidence les marqueurs de la taille du « ladder » contenant le bromure d'éthidium. Cela permet de calculer par la suite la taille des fragments d'ARN détectés.

En fin de migration, le gel doit être débarrassé d'un maximum de formaldéhyde avant d'entamer le transfert. Pour cela, il est rincé trois fois 10 minutes dans de l'eau ultra pure. Les ARN messagers sont ensuite transférés sur une membrane de nylon (Zeta Probe GT, BioRad) grâce au système « Turbo Blotter » (Schleicher et Schuell). Le transfert se fait par capillarité descendante avec du tampon 20XSSC (Saline Sodium Citrate). Le lendemain, les ARN sont fixés de manière covalente à la membrane de nylon par des rayons UV (150 mJ/cm²). La membrane est alors séchée dans du papier filtre ou utilisée immédiatement pour l'hybridation d'une sonde.

2.5.3. Hybridation de la membrane avec des sondes d'ADNc marquées au ³²P

2.5.3.1. Matériel

<u>Solution d'hybridation</u>	<u>20XSSC</u>
- Na ₂ HPO ₄ 0.12 M	- NaCl 2.9 M
- NaCl 0.25 M	- Citrate de sodium 0.29 M
- SDS 7%	
- Formamide désionisée 50%	
- pH 7.2	

2.5.3.2. Méthode

La membrane est placée sur un treillis en nylon et le tout est enroulé en cigare de telle manière que la membrane se trouve à l'intérieur du rouleau. Le cigare est placé dans un flacon Hybaid avec un peu de tampon 2XSSC. Il faut faire tourner un peu le flacon pour que l'ensemble se colle bien aux parois. Le tampon est remplacé par quelques millilitres de solution d'hybridation, puis afin d'ôter toute trace de tampon, la solution d'hybridation est vidée et remplacée par 10 ml de solution d'hybridation neuve. Le flacon est alors placé dans le four à hybridation (Hybaid) à 43°C pendant 1 heure afin de masquer les sites non spécifiques et diminuer le bruit de fond lors de la révélation.

Les sondes radioactives sont fabriquées par « Random Priming » (Kit « Random primers DNA labelling system », Invitrogen) à partir de fragments de restriction provenant de divers plasmides (tableau 2-2) servant de matrice. 20ng de fragments sont dilués dans 19µl d'eau stérile puis mis à bouillir 5 minutes pour séparer les deux brins. Ils sont ensuite mis sur glace pour éviter le réappariement. Les autres constituants du kit sont ensuite ajoutés : les primers aléatoires, les nucléotides non marqués (dATP, dTTP et dGTP), le fragment Kleenow de l'ADN polymérase et le nucléotide marqué au phosphore 32 (dCTP). Après 90 minutes d'incubation, la polymérisation est arrêtée par le « Stop Buffer ». Ensuite, les nucléotides non utilisés ainsi que les fragments de taille inférieure à 200pb sont éliminés par passage sur une colonne Biopsin-30 (BioRad). La sonde est mise à bouillir 5 minutes afin de désappairier les deux brins puis mise dans 10 ml de solution d'hybridation qui va remplacer celle se trouvant dans le flacon avec la membrane. L'hybridation dure une nuit avec rotation du flacon, dans le four à 43°C.

Le lendemain, la membrane est lavée plusieurs fois afin d'ôter les sondes non appariées ou liées de manière non spécifique à la membrane. On réalise des lavages de 15 minutes avec une concentration croissante en SSC et une augmentation de la température : 3 lavages avec la solution 2XSSC/0.1% SDS à 25°C, 2 lavages avec la solution 0.5XSSC/0.1 SDS chauffée à 43°C, 2 lavages avec la solution 0.5XSSC/0.1% SDS chauffée à 65°C. Pour la détection des transcrits des kératines, il faut procéder à trois lavages supplémentaires avec de la solution 0.1XSSC/0.1% SDS chauffée à 65°C. Une fois les lavages terminés, la membrane est emballée dans du cellophane afin qu'elle ne sèche pas. Suivant l'intensité du signal radioactif, la membrane est mise en présence d'un écran au phosphore (Storage Phosphore Screen, Packard) durant un temps variable. L'écran est ensuite scanné par un appareil CYCLONE (Packard). Le programme OptiQuant permet ensuite de quantifier l'intensité des différents spots et d'éliminer le bruit de fond. Ce sont ces valeurs densitométriques qui seront utilisées pour exprimer quantitativement les différents résultats obtenus.

RÉSULTATS

3.1. PRÉSENTATION DU MODÈLE DE CULTURE DES KÉRATINOCYTES ÉPIDERMIQUES HUMAINS

Dans cette première partie, nous allons présenter les caractéristiques principales du modèle de culture utilisé pour les kératinocytes épidermiques humains. Celui-ci nous permet d'étudier la différenciation de l'épiderme au travers de plusieurs stades de culture que sont la sous-confluence, la confluence et la post-confluence. Chacun d'eux représente et simule un état de différenciation retrouvé dans l'épiderme *in vivo* : Les cellules non différenciées de la couche basale, les cellules ayant entamé leur programme de différenciation et enfin les cellules se trouvant dans un état de différenciation plus avancé.

3.1.1. Morphologie de la culture cellulaire en microscopie à contraste de phase

La culture est observée régulièrement grâce à un microscope à contraste de phase afin surveiller le bon avancement de celle-ci. Ce suivi permet aussi de déterminer le stade auquel la culture se trouve.

La **sous-confluence** (SC) est atteinte lorsque les kératinocytes recouvrent environ 70% de la surface de la boîte de culture. Les cellules présentent une forme plutôt ovale. Les jonctions intercellulaires sont très réfringentes ce qui suggère des contacts peu étroits entre les cellules. De nombreuses mitoses peuvent être observées, ce qui traduit l'état de prolifération de la culture. Les cellules semblent également être mobiles, probablement dans le but de coloniser toute la surface disponible (Figure 3-1 A).

La **confluence** (C) se caractérise par une occupation de l'entièreté de la surface de la boîte de culture par les kératinocytes. Les cellules se tassent les unes contre les autres et adoptent une forme plutôt polyédrique. Les jonctions intercellulaires deviennent moins réfringentes. Les mitoses deviennent rares ce qui nous indique que les cellules ont cessé leur phase de prolifération intensive (Figure 3-1 B).

La **post-confluence** (PC) est atteinte, par convention du moins, quatre jours après la confluence. Par endroit, des îlots de stratification peuvent être observés et au sommet de ceux-ci, les kératinocytes « desquament » (Figure 3-1 C).

3.1.2. Expression de différents marqueurs de différenciation épidermique en terme d'ARN messagers

L'analyse de l'expression de marqueurs de différenciation a permis de montrer une corrélation entre le modèle de culture utilisé et la différenciation de l'épiderme. Les marqueurs recherchés ici sont la kératine 14, la kératine 10 et l'involucrine. L'expression des ARNm du gène 36B4 sert de contrôle de charge (Figure 3-2).

Résultats

À **sous-confluence**, les kératinocytes n'expriment quasiment pas d'ARNm codant pour la kératine 10 et peu pour l'involucrine. Ce profil est caractéristique des cellules de la couche basale de l'épiderme.

À **confluence**, l'expression de la kératine 10, marqueur de différenciation précoce, augmente. L'involucrine étant un marqueur de différenciation plus tardif, son expression n'est pas encore modifiée à ce stade. L'expression de la kératine 14 semble rester stable lors du passage de la sous-confluence à la confluence.

À **post-confluence**, l'augmentation dans l'expression de la kératine 10 se poursuit mais c'est l'augmentation de l'expression de l'involucrine qui se remarque le plus. L'expression est augmentée d'un facteur 15 environ par rapport au stade de la confluence. Même à post-confluence, le taux d'ARNm de la kératine 14 reste à un niveau comparable à celui de la sous-confluence et de la confluence. Ceci suggère que des cellules post-confluentes entament une différenciation plus tardive, mais qu'il reste quand même des cellules présentant un phénotype basal.

Ces observations sont facilitées par une représentation des données du Northern blot de manière quantitative, à l'aide d'un graphique (Figure 3-2 B). Pour cela, une analyse densitométrique de l'expression des ARNm est réalisée et standardisée grâce au contrôle de charge que constitue le « house keeping gene » 36B4.

3.2. CARACTÉRISATION DE L'EXPRESSION ET DE L'ACTIVATION DE LA MAP KINASE p38 ET DE HSP27 DANS LE MODÈLE DE DIFFÉRENCIATION DES KÉRATINOCYTES

Des expériences sur l'expression et l'activation de la MAPK p38 et d'HSP27 ont déjà été réalisées dans notre laboratoire (mémoires de Conny Mathay et Arianne Messine, 2004). Dans cette seconde partie du travail, nous avons voulu reproduire ces expériences sur une souche de kératinocytes différente et vérifier si les résultats concordaient.

3.2.1. Expression d'HSP27 en fonction de la densité cellulaire

Le niveau d'expression des ARN messagers codant pour HSP27 a été mesuré par Northern blot et densitométrie afin de caractériser leur expression au cours de la différenciation des kératinocytes en culture. Pour cela, les cultures sont menées jusqu'aux stades de SC, de C et de PC.

L'image du Northern blot nous suggère une augmentation de l'expression d'HSP27 au cours de la différenciation (Figure 3-3 A). Une représentation quantitative des pistes rend mieux compte de l'évolution de l'expression des ARNm d'HSP27 (Figure 3-3 B). De la SC à la C, nous observons une augmentation importante du niveau d'expression des ARNm codant pour HSP27. Par contre, de la C à la PC, nous n'observons pas de modification importante de cette expression. Le niveau semble rester relativement constant à partir de la confluence. Ceci signifie que le niveau maximal d'expression d'HSP27 est atteint au stade de confluence et se maintient pendant le reste de la culture, jusqu'à la post-confluence.

3.2.2. Activation de la MAP kinase p38 et d'HSP27 en fonction du stade de culture

La MAP kinase p38 est présente dans les kératinocytes dès le stade de sous-confluence. Le taux total de cette protéine ne semble pas varier en fonction de l'avancement de la culture (Figure 3-4). Cela suggère que lors de la différenciation des kératinocytes, la quantité totale de cette kinase reste stable.

Par contre, en ce qui concerne sa phosphorylation et donc son activation, il est possible de percevoir une légère augmentation avec la différenciation tardive à post-confluence. Cette observation suggère que la MAP kinase p38 active jouerait un rôle dans les mécanismes de différenciation des kératinocytes.

La « heat shock protein » 27 est une protéine présente dans les kératinocytes dont l'activation semble dépendre du stade de culture considéré, comme le montre la figure 3-4. Sous sa forme totale, HSP27 semble être une protéine présente dans les kératinocytes de manière assez constante, malgré l'observation faite précédemment (Figure 3-3) au niveau de ses ARNm. En effet, le taux d'ARNm augmente avec la différenciation alors que la quantité de protéine totale, elle, semble rester stable.

La forme phosphorylée d'HSP27 est détectable dès le stade de sous-confluence, à un taux déjà important. La quantité de protéine phosphorylée augmente ensuite avec la différenciation des kératinocytes. Il est clair que le taux de phosphorylation est plus important au stade de confluence qu'au stade de sous-confluence et il augmente encore avec la post-confluence. Ceci suggère que HSP27 jouerait un rôle dans les mécanismes de différenciation des kératinocytes.

3.2.3. Observation d'un lien entre l'activité de la MAP kinase p38 et celle d'HSP27 dans les kératinocytes en différenciation

3.2.3.1. Observation au niveau protéique

Vu la relation décrite dans la littérature entre l'activation de la MAPK p38 et la phosphorylation d'HSP27 (Jonak & al., 2004 ; Berkowitz & al., 2005), nous avons voulu savoir si ce lien fonctionnait lors de la différenciation des kératinocytes. La littérature montre l'existence de deux kinases intermédiaires qui sont les MAPKAPK 2 et 3. Afin d'investiguer cette voie, nous avons soumis les kératinocytes à un traitement avec des inhibiteurs spécifiques de la MAP kinase p38 α et β . Nous avons utilisé deux molécules de la famille des pyridinyl imidazoles qui sont PD169316 et SB202190 (Calbiochem). Ces molécules bloquent l'activité kinase de la MAPK p38 en l'empêchant de lier l'ATP et ainsi de phosphoryler ses substrats (Pargellis & al., 2002).

Au niveau de la phosphorylation de la MAP kinase p38, nous pouvons déjà observer des effets dus à la présence des inhibiteurs car il y a autophosphorylation (Figure 3-5). Principalement dans le cadre du traitement avec l'inhibiteur SB202190, nous observons une légère augmentation de la phosphorylation de la MAP kinase p38. Cette observation nous incite à penser que la simple présence de l'inhibiteur peut induire un stress pour la cellule. On assisterait alors, en réponse à ce stress, à l'activation de voies de signalisation qui mènent à la phosphorylation de la MAPK p38. Nous pouvons imaginer que nous assistons ici à une sorte de compétition entre l'effet inhibiteur de la molécule SB202190 sur l'activité de la MAPK p38 et l'activation de la voie des MAPK p38 due au stress qu'induit la présence de cette molécule.

La forme totale d'HSP27 montre un profil constant au cours de la différenciation comme expliqué au point 3.2.1. Les légères variations observées semblent dues à un chargement en protéines qui varie légèrement. La quantité de forme phosphorylée d'HSP27 montre une variation due notamment à l'évolution de la culture comme décrite précédemment, mais surtout, due à la présence des deux inhibiteurs de la MAPK p38 (Figure 3-5). En effet, lorsque les kératinocytes sont traités avec 15 μ M de PD169316 ou 10 μ M de SB202190, nous observons une diminution nette dans la quantité d'HSP27 phosphorylée et ceci aux trois stades de culture étudiés. Remarquons cependant que cette diminution de l'activité d'HSP27 lors de l'inhibition de la MAPK p38 n'est pas totale. Cette diminution partielle de la phosphorylation d'HSP27 nous suggère qu'il n'existe qu'un contrôle partiel de l'activité d'HSP27 par la MAPK p38. Il doit donc exister une autre voie qui intervient sur la phosphorylation d'HSP27. Celle-ci pourrait agir sur les intermédiaires connus qui sont les MAPKAPK 2 ou 3, ou via d'autres intermédiaires qui ne seraient pas connus, ou pas encore associés à cette voie.

3.2.3.2. Observation des effets des inhibiteurs de la MAPK p38 au niveau de l'expression de marqueurs de différenciation

Après avoir observé les effets que pouvaient avoir les deux inhibiteurs de la MAPK p38 au niveau de l'activation par phosphorylation de la MAPK p38 elle-même et d'HSP27, nous avons voulu voir si il y avait des modifications au niveau de l'expression des différents marqueurs de différenciation ainsi qu'au niveau de l'expression d'HSP27. Nous avons donc procédé aux mêmes traitements des kératinocytes que pour l'étude des protéines et réalisé un Northern blot illustré à la figure 3-6 A.

Ce Northern blot nous suggère un effet des inhibiteurs PD169316 et SB202190 principalement au stade de PC (Figure 3-6 A).

Une analyse quantitative de l'expression relative est nécessaire pour pouvoir en dire plus sur les effets de ces molécules (Figure 3-6 B).

Au niveau de la SC, l'utilisation des deux inhibiteurs ne semble pas induire de modification dans l'expression des différents marqueurs de différenciation observés, ni dans l'expression d'HSP27.

Lorsque l'on se trouve à C, les kératinocytes ne semblent pas répondre aux inhibiteurs de manière univoque. Tantôt nous observons une légère augmentation dans l'expression d'un marqueur, tantôt, une diminution. Nous ne pouvons donc rien affirmer à ce sujet.

Quand la culture atteint le stade de la PC et que nous appliquons les inhibiteurs de la MAPK p38, il semble que la réponse des kératinocytes soit plus nette. En effet, lors de l'observation des effets des inhibiteurs sur l'expression des quatre gènes visés, nous remarquons, dans tous les cas, une diminution de l'expression des ARN messagers codant pour ces gènes. De plus, la diminution semble être plus intense lors de l'utilisation de l'inhibiteur SB202190 que lors de l'utilisation de PD169316.

3.3. LES VOIES DE SIGNALISATION INDUITES PAR L'EXTRACTION DU CHOLESTÉROL MEMBRANAIRE SUITE À UN TRAITEMENT À LA MÉTHYL- β -CYCLODEXTRINE

Dans cette troisième partie, nous avons voulu voir quels étaient les effets de l'extraction du cholestérol membranaire sur la différenciation des kératinocytes et sur les signalisations aboutissant à la voie des MAPK p38 et d'HSP27.

Tout d'abord, nous avons recherché les effets au niveau des marqueurs de différenciation cellulaire que sont les kératines 10 et 14 et l'involucrine. Ensuite, nous avons analysé les voies de signalisation induites suite au traitement avec la méthyl- β -cyclodextrine (M β CD) et quelles étaient les protéines participant à ces voies.

3.3.1. Effets de la déplétion en cholestérol sur l'expression des marqueurs de différenciation

Pour réaliser ce traitement, les cultures de kératinocytes sont menées jusqu'à la confluence. Des expériences menées par Conny Mathay dans le cadre de son mémoire (2004) et par Ralph Jans dans le cadre de sa thèse (2004) nous ont montré que ce n'est qu'à ce stade que les kératinocytes répondent au traitement à la M β CD par une modification de l'expression de certains gènes. Suite à leurs résultats, nous avons décidé de traiter les kératinocytes durant 1 heure avec une concentration de 7.5 mM en M β CD. Cette concentration ne présente pas une toxicité trop importante pour les cellules, leur viabilité reste de l'ordre de 70%. Afin de pouvoir observer des effets au niveau de la modification de l'expression des gènes, la déplétion en cholestérol doit se poursuivre 17 heures en présence de lovastatine afin d'empêcher la néosynthèse de cholestérol par les kératinocytes.

L'analyse par Northern blot (Figure 3-7 A) nous montre qu'il y a un effet de la déplétion en cholestérol sur l'expression de marqueurs de différenciation. La représentation quantitative des spots nous renseigne mieux sur l'importance des effets de la M β CD (Figure 3-7 B). Nous observons une légère diminution dans le taux d'expression de la kératine 14. La kératine 10 voit son expression légèrement augmentée suite à la déplétion en cholestérol. L'effet le plus important s'observe au niveau de l'expression de l'involucrine. Le niveau obtenu au stade de la confluence, en conditions normales, est pris comme référence et déterminé à 100% d'expression. Le traitement par la M β CD induit une augmentation de l'expression d'involucrine d'environ un facteur 10. Au vu de ces résultats, nous ne nous intéresserons plus à l'expression des kératines dans les expériences suivantes. Les effets de la déplétion en cholestérol sur leur expression montre moins d'intérêt que pour l'involucrine.

Ces résultats nous suggèrent que l'extraction du cholestérol membranaire induit une différenciation tardive des kératinocytes. En effet, le phénotype observé suite au traitement des cellules à confluence nous rappelle le phénotype observé à post-confluence, dans notre modèle de culture des kératinocytes (Figure 3-2). Cela nous confirme la capacité de la M β CD à induire la différenciation des kératinocytes in vitro (Jans & al., 2004).

3.3.2. Recherche des effets de la déplétion en cholestérol, associée ou non à un traitement avec les inhibiteurs de la MAPK p38, sur la phosphorylation de la MAPK p38 elle-même et celle d'HSP27

3.3.2.1. Observation de l'activation de la MAPK p38 et d'HSP27

Au vu des résultats précédents montrant un effet de la M β CD sur l'expression de certains gènes, nous avons voulu rechercher par quelles voies de signalisation ce mécanisme passait. Les résultats de Conny Mathay et Ralph Jans (2004) nous ont indiqué que l'induction de l'expression des gènes semblait passer par la voie des MAP kinases p38. Nous avons donc voulu vérifier ces résultats en traitant nos kératinocytes en culture 1 heure avec 7.5 mM de M β CD et en poursuivant le traitement 17 heures avec 10 μ M de lovastatine (Jans & al., 2004).

Les résultats du Western blot réalisé nous confirment que l'extraction du cholestérol active la voie de la MAPK p38 (Figure 3-8). Nous observons en effet une augmentation nette de la quantité de MAPK p38 phosphorylée lors du traitement. Cette phosphorylation disparaît lorsque les kératinocytes traités sont également mis en présence de l'un ou l'autre des inhibiteurs de la MAPK p38. Ceci confirme simplement l'efficacité des inhibiteurs sur l'auto-phosphorylation et l'activation de la MAPK p38.

Ensuite nous avons étudié la phosphorylation d'HSP27 dans ces mêmes conditions de traitement. Nous savions, par les résultats précédents, que l'activation d'HSP27 était partiellement dépendante de l'activité de la MAPK p38. Il était intéressant de voir si dans le cadre du traitement par la M β CD, nous pouvions retrouver ce lien entre les deux protéines.

Les résultats de la figure 3-8 nous indiquent que la relation entre la MAPK p38 et HSP27 est conservée lors de la déplétion en cholestérol.

Le niveau d'HSP27 active n'est pas nul dans les conditions contrôles puisque les kératinocytes ont déjà une activité HSP27 à sous-confluence et que celle-ci augmente avec l'évolution de la culture (Figure 3-5). Nous avons déjà montré qu'une inhibition de la phosphorylation de la MAPK p38 induisait une diminution dans la phosphorylation d'HSP27. Cette figure confirme les résultats obtenus précédemment en montrant une diminution de la phosphorylation d'HSP27 lorsque l'activité kinase de la MAPK p38 est bloquée par des inhibiteurs. La relation entre les deux protéines est donc similaire lorsque l'on déplete les kératinocytes en cholestérol et lors de la différenciation simulée par notre modèle.

Ces résultats confirment le lien qui existe entre l'activité de la MAP kinase p38 et la phosphorylation de HSP27 dans les kératinocytes.

3.3.2.2. Observation de l'expression des ARNm d'HSP27 et de l'involucrine suite à la déplétion en cholestérol et à l'utilisation des inhibiteurs de la MAPK p38

Après avoir observé les effets de la M β CD au niveau des phosphorylations, nous avons analysé l'expression d'HSP27 et de l'involucrine au niveau de leurs d'ARNm. Nous ne nous sommes plus intéressés aux kératines 10 et 14 puisque les résultats précédents (point 3.2.1.) nous indiquent que l'effet de la déplétion sur le taux d'expression de ces ARNm est assez minime, comparé à l'effet sur l'expression de l'involucrine.

Nous pouvons ainsi observer que le traitement avec la M β CD diminue d'environ 30 à 50% le niveau d'expression d'HSP27 (Figure 3-9 B). Dans le cas des cellules contrôles, la présence des inhibiteurs de la MAPK p38 semble augmenter l'expression d'HSP27. Par contre, ces mêmes traitements réalisés sur des cellules déplétées en cholestérol nous montrent un effet inverse des inhibiteurs. L'expression d'HSP27 est diminuée par la présence des inhibiteurs de la MAPK p38 dans le milieu.

L'observation du niveau d'expression de l'involucrine dans les kératinocytes témoins ne nous montre pas d'effet notable des inhibiteurs (Figure 3-9 B). L'expression d'involucrine au stade de confluence est faible et c'est peut-être pour cette raison que les effets de l'inhibition de la MAPK p38 se font peu ressentir. Par contre, quand les kératinocytes sont déplétés en cholestérol, l'expression de l'involucrine est fortement augmentée. Les résultats observés dans ces conditions, lors de l'ajout des inhibiteurs, nous montrent que la MAPK p38 intervient dans la régulation de l'expression de l'involucrine. En effet, l'inhibition de la MAPK p38 réduit fortement l'expression de l'involucrine par rapport à la condition témoin, c'est-à-dire les kératinocytes traités avec la M β CD.

3.3.3. Recherche de l'implication des Rho GTPases dans les voies de signalisation induites par la méthyl- β -cyclodextrine

À la suite des résultats obtenus précédemment, nous avons voulu explorer plus en détail la voie de signalisation induite par l'extraction du cholestérol dans les kératinocytes. Plus précisément, nous avons recherché les effecteurs se trouvant en amont de la voie des MAP kinases p38 et d'HSP27.

Lors de la réalisation de son mémoire en 2004, Conny Mathay a cherché si les protéines kinases C (PKC) sont l'intermédiaire de la signalisation induite par l'extraction du cholestérol et conduisant à la phosphorylation de la MAPK p38. Les expériences menées avec un inhibiteur spécifique des PKC, GF109203X, ont montré que les PKC n'étaient pas cet effecteur situé en amont des MAPK p38.

Dans ce travail, nous avons testé une autre possibilité en nous intéressant aux Rho GTPases. En effet, les Rho GTPases interviennent dans la régulation de l'expression de certains gènes de la différenciation des kératinocytes, dont l'involucrine (McMullan & al., 2003). Or nous savons que l'expression de celle-ci est précisément affectée par le traitement à la M β CD.

Notons que la littérature attribue aux Rho GTPases un rôle « inhibiteur » sur l'activation de la MAPK p38. En d'autres mots, une inhibition des Rho GTPases mène à l'activation de la MAPK p38 (Cheng & al., 2002).

Pour explorer le rôle des Rho GTPases, nous disposons de toxine B de *Clostridium difficile* fournie gracieusement par le Professeur Klaus Aktories (University of Freiburg, Allemagne). Cette toxine inhibe les Rho GTPases par une réaction de glycosylation, les empêchant par conséquent de lier leurs divers effecteurs (Klaus Aktories, 1997). Les cultures ont été menées jusqu'à la confluence et nous avons procédé à deux types de déplétion en cholestérol : un traitement de 1 heure et un traitement de 18 heures. Pour chacun, nous avons créé deux conditions : des cultures témoins, qui ne subissent que les traitements avec la toxine B à des concentrations croissantes et des cultures traitées en plus de la toxine avec la M β CD. Les effets de la toxine ont été observés au niveau de la phosphorylation de la MAPK p38 et d'HSP27.

3.3.3.1. Observation des effets de la toxine B de *Clostridium difficile* sur la phosphorylation de la MAPK p38 et d'HSP27 dans le cadre d'une déplétion en cholestérol pendant 1 heure

Nous avons tout d'abord confirmé, grâce à ces résultats, l'activation par phosphorylation de la MAPK p38 suite à une extraction du cholestérol membranaire par la méthyl- β -cyclodextrine (Figure 3-10 A). Nous remarquons aussi que cet effet de la déplétion en cholestérol peut déjà être observé après une heure de traitement.

En ce qui concerne les effets des différentes concentrations en toxine B, nous allons d'abord décrire les résultats obtenus pour les cellules témoins et ensuite ceux obtenus pour les cellules traitées avec la M β CD (Figure 3-10 A).

Lorsque les kératinocytes témoins sont mis en présence de la toxine B, dès la plus faible concentration, nous observons une augmentation de la phosphorylation de la MAPK p38. Cette phosphorylation, semble relativement stable, quelle que soit la concentration en toxine utilisée.

Nous observons donc un effet de la toxine B sur la quantité de forme phosphorylée de la MAPK p38. Ceci confirme les résultats du groupe de Cheng & al (2002) qui observe aussi une augmentation de la phosphorylation de la MAPK p38 suite à la présence de toxine B.

Par contre, nous n'observons pas de modification significative de la quantité de la forme phosphorylée d'HSP27 en fonction des concentrations de la toxine B de *Clostridium difficile* appliquées aux kératinocytes.

Les kératinocytes déplétés en cholestérol et traités par la toxine B, présentent un profil de phosphorylation de la MAPK p38 stable, même en présence de toxine B (Figure 3-10 A). C'est-à-dire que nous n'observons pas de modification en terme de phosphorylation, de la MAPK p38 suite à l'inhibition des Rho GTPases. Le niveau maximal de phosphorylation de la MAPK p38 semble être déjà atteint suite à l'extraction du cholestérol, ou peut être que les effets des deux traitements ne sont pas cumulatifs, c'est-à-dire que l'activation de la MAPK p38 par la déplétion en cholestérol s'est déjà réalisée suite à une inhibition des Rho GTPases. En ce qui concerne HSP27, de façon surprenante, nous n'observons aucun effet du à la présence de la toxine B dans le milieu, cela, quelle que soit la concentration en toxine utilisée. Ceci avait déjà été observé pour les kératinocytes témoins et cela se vérifie pour les cellules déplétées en cholestérol. Cette observation suggère que la phosphorylation d'HSP27 dans les kératinocytes confluent ne dépend pas de l'activation de la MAPK p38, contrairement aux résultats de la figure 3-5.

3.3.3.2. Observation des effets de la toxine B de *Clostridium difficile* sur la phosphorylation de la MAPK p38 et d'HSP27 lors d'une déplétion du cholestérol de 18 heures

Les résultats obtenus lors d'une déplétion en cholestérol de 18 heures nous montrent que l'effet de la toxine est alors différent.

Tout d'abord, nous ne détectons pas de forme phosphorylée de la MAPK p38 pour les kératinocytes contrôles (Figure 3-10 B). L'ajout de toxine B dans le milieu induit une phosphorylation de la MAPK p38 comme après 1 heure de déplétion. Mais contrairement aux résultats obtenus précédemment lors du traitement de 1 heure des kératinocytes avec la toxine B, nous observons un effet de la concentration en toxine sur la quantité de forme active de MAPK p38 détectée. En effet, l'augmentation de la concentration en toxine diminue la phosphorylation de la MAPK p38. La quantité de forme phosphorylée en présence de 5 ng/ml de toxine est plus importante qu'en présence de 10 ng/ml. Et cela se vérifie avec les concentrations de 50 et 100 ng/ml.

Lors de l'observation de la phosphorylation d'HSP27 nous remarquons, comme précédemment, que celle-ci n'est pas modifiée suite à l'incubation des kératinocytes avec une concentration croissante en toxine B.

Lorsque les cellules sont traitées simultanément avec la M β CD pour extraire le cholestérol, nous observons d'abord qu'il y a bien une activation importante de la MAPK p38 suite à la déplétion en cholestérol. Cependant, la présence de toxine dans le milieu diminue le niveau de phosphorylation de la MAPK p38 induite par l'extraction du cholestérol. Cette diminution est à mettre en corrélation avec l'augmentation de la concentration en toxine B dans le milieu.

Dans ces mêmes conditions, la phosphorylation d'HSP27 ne présente pas de variation en fonction de la concentration en toxine B appliquée. Les résultats obtenus, ici et précédemment, en ce qui concerne l'activation d'HSP27 nous suggèrent que le lien entre la MAPK p38 et HSP27 que nous avons observé dans nos expériences précédentes disparaît lors de l'utilisation de la toxine B de *Clostridium difficile*. En effet, jusqu'à présent, lorsque nous inhibons l'activité de la MAPK p38, nous observons une diminution de la phosphorylation d'HSP27. Cette relation n'est plus vérifiée dans cette expérience.

3.3.3.3. Evaluation de la viabilité cellulaire grâce au test MTT suite aux traitements de 1 heure et de 18 heures avec la toxine B de *Clostridium difficile*

Suite à l'observation de la morphologie des kératinocytes au microscope à contraste de phase après les différents traitements avec la toxine B de *Clostridium difficile* (Figure 3-11), nous avons décidé de mesurer la viabilité cellulaire pour chaque condition de test. En effet, les cellules traitées avec la toxine uniquement présentent une morphologie très altérée. Les kératinocytes semblent perdre les liens intercellulaires établis à la confluence et se rétractent. Ils adoptent une forme étoilée dès la concentration la plus faible en toxine (5ng/ml). Cet aspect s'accroît avec l'augmentation de la concentration en toxine à laquelle les kératinocytes sont soumis. Les kératinocytes déplétés en cholestérol présentent également une modification de leur morphologie dès que l'on ajoute de la toxine au milieu de culture. Néanmoins, l'intensité du phénomène altérant leur morphologie semble moins importante. En effet, nous constatons une rétraction des cellules traitées avec la M β CD et la toxine B moins importante par rapport aux cellules traitées uniquement avec la toxine B. Les observations les

plus intrigantes ont été faites pour les traitements de 18 heures (Figure 3-11). La modification morphologique des kératinocytes après seulement 1 heure de traitement est moins évidente, mais un test MTT a quand même été réalisé pour ces conditions. En tenant compte de ces observations morphologiques, nous avons cherché si la M β CD protégeait les kératinocytes des effets de la toxine B de *Clostridium difficile*.

La réalisation du test MTT a pour but d'évaluer la toxicité des différents traitements que nous faisons subir aux kératinocytes. En effet, le changement dans la morphologie traduit un état de souffrance des cellules.

Les résultats obtenus pour les **traitements de 1 heure** avec la toxine B des cellules témoins et des cellules traitées avec la M β CD (Figure 3-12 A) nous montrent que la viabilité cellulaire reste élevée quel que soit le traitement. Nous pouvons certainement attribuer ces résultats au fait que nous ne traitons les cellules qu'une heure et que les effets toxiques éventuels demandent une incubation plus longue pour se manifester sur la viabilité cellulaire. Nous pouvons observer que le traitement des kératinocytes avec la M β CD ne diminue pas de manière significative leur viabilité par rapport aux cellules témoins.

Les résultats du test MTT réalisé sur les cultures soumises à un **traitement de 18 heures** nous apportent d'autres informations (Figure 3-12 B). Tout d'abord nous pouvons observer que le traitement avec la M β CD diminue de manière significative la viabilité des cellules. Nous pouvons estimer que cette perte de viabilité est de l'ordre de 30%. En ce qui concerne les cellules témoins, nous remarquons que dès qu'elles sont soumises à la toxine B, même à la concentration la plus faible de 5ng/ml, il y a une perte de viabilité hautement significative de l'ordre de 30%. La viabilité cellulaire chute encore lorsque la concentration en toxine B augmente, jusqu'à atteindre environ 55%.

Par contre, lorsque nous observons les résultats pour les kératinocytes traités avec la M β CD, nous n'observons plus de perte de viabilité due au traitement avec la toxine B. La viabilité cellulaire se maintient d'ailleurs au même niveau que les cellules sans toxine, uniquement déplétées en cholestérol.

3.3.4. Rôle de la protéine ROCK en tant qu'intermédiaire dans la voie de signalisation induite par l'extraction du cholestérol et les Rho GTPases

Les expériences portant sur l'implication des Rho GTPases lors de l'extraction du cholestérol, nous ont suggéré que celles-ci interviennent dans l'initiation de voies de signalisation suite à la déplétion en cholestérol. Nous avons alors recherché si la protéine ROCK est l'intermédiaire entre les Rho GTPases et les MAPK p38.

L'intérêt vis-à-vis de cette protéine provient de la littérature. En effet, un article de McMullan (2003) nous suggère qu'il existe une relation entre les Rho GTPases et la protéine ROCK dans le contexte d'une induction de la différenciation des kératinocytes obtenue par leur mise en suspension. Ces auteurs montrent qu'il y a une expression d'involucrine accrue lorsqu'ils mettent les cellules en suspension, ce qui correspond à une entrée en différenciation tardive des kératinocytes (McMullan & al., 2003). Lorsqu'ils utilisent l'inhibiteur de la protéine ROCK, Y-27632, la proportion de cellules présentant le phénotype différencié diminue de moitié environ. Ceci nous suggère une implication de la protéine ROCK dans la

différenciation des kératinocytes en culture. Ils ont également montré que dans cette voie, les Rho GTPases interviennent en amont de la protéine ROCK.

Nous avons donc recherché l'implication éventuelle de ROCK dans le phénotype différencié induit par la déplétion en cholestérol. En effet, l'extraction du cholestérol membranaire induit un phénotype différencié, comparable à celui induit par la mise en suspension de la culture.

Afin de rechercher l'implication de ROCK, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique de cette protéine : Y-27632 (McMullan & al., 2003 ; Kamaraju & Roberts, 2005). Nous avons utilisé des concentrations en inhibiteur allant de 1 μ M à 20 μ M. Pour pouvoir comparer ces résultats avec ceux obtenus par l'inhibition des Rho GTPases, nous avons réalisé des traitements de 1 heure et de 18 heures et les effets ont été observés sur les phosphorylations de la MAPK p38 et d'HSP27. Nous avons également procédé à un test MTT afin d'évaluer la toxicité des différents traitements et concentrations.

3.3.4.1. Effets de l'inhibition de la protéine ROCK sur la phosphorylation de la MAPK p38 et d'HSP27 lors d'une déplétion de 1 heure en cholestérol

Sur les cellules témoins, l'inhibition de la protéine ROCK ne semble pas avoir d'impact. En effet, nous n'observons pas d'effet sur la phosphorylation de la MAPK p38, ni sur celle d'HSP27 (Figure 3-13 A). Le niveau d'activation d'HSP27 observé résulte probablement du fait que les cultures sont à confluence et qu'à ce stade les kératinocytes présentent un niveau de phosphorylation d'HSP27 relativement important.

Les kératinocytes déplétés en cholestérol montrent l'activation habituelle de la MAPK p38 sans qu'il n'y ait d'inhibiteur dans le milieu. Lorsque nous inhibons la protéine ROCK par des concentrations croissantes en inhibiteur, nous observons une diminution de l'activité de la MAPK p38 qui est fonction de la concentration. Dans ce cas, la phosphorylation d'HSP27 semble augmentée par l'extraction du cholestérol.

3.3.4.2. Effets de l'inhibition de la protéine ROCK sur la phosphorylation de la MAPK p38 et d'HSP27 lors d'une déplétion de 18 heures en cholestérol

Après 18 heures de déplétion en cholestérol, la réponse des kératinocytes à l'inhibition de la protéine ROCK n'est plus semblable.

En effet, les cellules témoins présentent une phosphorylation de la MAPK p38 suite à la présence de l'inhibiteur Y-27632 (Figure 3-13 B). Un traitement de 1 heure avec l'inhibiteur de la protéine ROCK est peut être insuffisant pour induire l'activation de la voie des MAPK p38, mais une incubation plus longue, de 18 heures par exemple, induit ce résultat. Nous pouvons remarquer que cette observation après 18 heures d'inhibition de la protéine ROCK dans les kératinocytes témoins, est semblable à l'observation après un traitement de 1 heure inhibant les Rho GTPases dans ces cellules.

Dans les kératinocytes traités avec la M β CD, nous pouvons observer un effet de l'inhibition de la protéine ROCK différent (Figure 3-13 B). C'est-à-dire que l'inhibition de celle-ci induit une diminution de la phosphorylation de la MAPK p38. Et il semble que l'effet soit dépendant de la dose d'inhibiteur utilisée. Ce profil rejoint celui déjà obtenu pour le traitement d'une

heure avec cet inhibiteur et pour le traitement de 18 heures visant à inhiber les Rho GTPases par la toxine B de *Clostridium difficile*, suggérant le rôle de cette voie dans l'activation de la MAPK p38.

Par ailleurs, il n'existe de nouveau pas de lien entre la MAPK p38 et HSP27. En effet, la diminution dans l'activation de la MAPK p38 ne se reflète pas au niveau de la phosphorylation d'HSP27.

En résumé, dans le cadre de la déplétion en cholestérol, la réponse des kératinocytes à l'inhibition des Rho GTPases, après 18 heures, ou de la protéine ROCK, après 1 et 18 heures, présente le même profil. Cela nous suggère que la protéine ROCK est l'effecteur des Rho GTPases dans la voie de signalisation induite par l'extraction du cholestérol et menant à l'activation de la voie de la MAPK p38.

3.3.4.3. Evaluation de la viabilité cellulaire suite à des traitements de 1 et 18 heures avec l'inhibiteur de la protéine ROCK

Étant donné que nous avons réalisé un test de viabilité pour les cellules traitées avec la toxine B de *Clostridium difficile*, nous en avons fait autant pour les cellules traitées avec l'inhibiteur Y-27632. Nous voulions voir si les effets des deux traitements sur la viabilité cellulaire étaient similaires, ce qui pourrait vouloir dire que les deux types de protéines touchées, les Rho GTPases et ROCK, sont des intermédiaires liés dans les voies de signalisation induites par l'extraction du cholestérol.

L'observation des résultats **après 1 heure** ne nous montre pas de toxicité significative due à la présence de l'inhibiteur de la protéine ROCK. En effet, les différentes concentrations appliquées aux kératinocytes n'induisent pas de perte de viabilité, que ce soit pour les cellules témoins ou les cellules déplétées en cholestérol (Figure 3-14 A). La différence de viabilité observée entre les deux courbes est la conséquence du traitement par la M β CD et est significative. Ce seul traitement induit une chute de la viabilité, comme montré dans les résultats précédents (point 3.3.3.3.).

Les résultats produits **après 18 heures** montrent un profil différent (Figure 3-14 B). Les kératinocytes témoins réagissent à l'inhibition de la protéine ROCK par une perte de viabilité, qui semble d'autant plus importante que la concentration en inhibiteur est élevée. Avec une concentration de 1 μ M, nous observons déjà une chute de la viabilité d'environ 15%. Avec la concentration maximale de 20 μ M, la perte de viabilité atteint environ 35%. Ces observations suggèrent un effet négatif de la concentration en inhibiteur de la protéine ROCK sur la viabilité des kératinocytes.

Lorsque l'on observe les kératinocytes déplétés en cholestérol soumis aux mêmes concentrations en inhibiteur, le profil de l'évolution de la viabilité cellulaire est tout à fait opposé. En effet, la viabilité des kératinocytes contrôles déplétés en cholestérol est moindre que celle des kératinocytes témoins lorsqu'ils ne sont soumis à aucun autre traitement. Par contre, dès que l'on ajoute de l'inhibiteur dans le milieu de culture, les kératinocytes semblent être protégés contre les effets toxiques de la déplétion en cholestérol. La viabilité des kératinocytes augmente avec la concentration en inhibiteur dans le milieu. Ces résultats sont significatifs. Ce profil étonnant est à l'opposé de celui présenté par les kératinocytes témoins subissant les mêmes traitements et suggère une interaction entre ROCK, le cholestérol membranaire et la viabilité cellulaire.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Ce mémoire s'intéresse aux conséquences produites par l'extraction du cholestérol membranaire sur la régulation du programme de différenciation des kératinocytes. En effet, dans ces conditions, les kératinocytes expriment de façon précoce l'involucrine, un marqueur tardif de la différenciation épidermique (Jans & al., 2004).

Dans ce cadre, nous avons recherché des éventuels effecteurs de la voie de signalisation induite par l'extraction du cholestérol.

4.1. La voie des MAPK p38 est impliquée dans la régulation de l'expression d'involucrine lors de la différenciation des kératinocytes

Nous avons d'abord confirmé le rôle des MAPK p38 sur l'expression de l'involucrine (Jans & al., 2004 ; Efimova & al., 2002 ; 2003). L'utilisation des deux inhibiteurs des MAPK p38 α et β a montré que l'inhibition de la voie des MAPK p38 induisait une diminution de l'expression d'involucrine d'environ 40% pour l'inhibiteur PD169316 et 65% pour l'inhibiteur SB202190, lors de la différenciation tardive des kératinocytes.

Ces expériences montrent l'implication partielle des isoformes α et β de la MAPK p38, mais ne nous permettent pas d'évaluer l'implication de l'isoforme δ . Mais la littérature a déjà montré que cette isoforme est aussi impliquée dans cette régulation (Efimova & al., 2002 ; 2003).

Au vu de ces résultats, nous pouvons proposer que les trois isoformes de la MAPK p38 exprimées par les kératinocytes sont impliquées dans la régulation de l'expression d'involucrine au cours de la différenciation des kératinocytes.

4.2. L'implication de la MAPK p38 dans l'apparition du phénotype différencié lors du traitement par la M β CD

Un traitement des kératinocytes par la M β CD induit l'apparition précoce d'un phénotype différencié qui se caractérise par une augmentation importante de l'expression d'involucrine. Une étude de notre laboratoire (Jans & al., 2004) a montré que dans le cadre de la déplétion en cholestérol, c'est l'isoforme α de la MAPK p38 qui est activée par le traitement avec la M β CD. L'utilisation de l'inhibiteur spécifique des isoformes α et β de la MAPK p38, PD169316, montre que lorsque ces deux isoformes de la MAPK p38 sont inhibés, l'expression d'involucrine n'est plus augmentée suite à la déplétion en cholestérol.

Dans nos expériences, nous avons d'abord confirmé ces résultats, car l'utilisation de deux inhibiteurs spécifiques des isoformes α et β , PD169316 et SB202190 (Stoll & al., 2003), les montre impliquées dans la régulation de l'expression de l'involucrine. En effet, lorsque l'on ajoute aux cellules déplétées en cholestérol l'un ou l'autre des inhibiteurs, l'activation de la MAPK p38 et l'expression de l'involucrine diminuent de manière importante.

Par ces observations, nous confirmons les résultats décrits à propos des isoformes α et β , mais nous ne pouvons rien dire sur l'implication de l'isoforme δ lors de l'extraction du cholestérol.

Cependant, comme l'activateur principal de l'isoforme δ , la PKC, n'est pas impliquée dans ce processus (C. Mathay, 2004), nous avons cherché d'autres activateurs de la MAPK p38.

4.3. Les Rho GTPases en tant qu'initiateur de la voie de signalisation induite par l'extraction du cholestérol membranaire ?

La littérature nous fournit de nombreuses pistes quant à l'implication des Rho GTPases sur l'activation des MAPK p38 et donc sur leur implication dans la différenciation des kératinocytes épidermiques.

Dans des cellules HaCaT, des kératinocytes immortalisés, il a été montré que les Rho GTPases régulaient l'activité des MAPK p38 de manière négative (Cheng & al., 2002). En effet, l'inhibition des Rho GTPases par la toxine B de *Clostridium difficile* induit l'activation de la MAPK p38. Nous avons montré que dans les kératinocytes normaux que nous étudions au laboratoire, nous obtenons le même résultat. Suite à l'inhibition des Rho GTPases pendant une heure, nous observons une activation de la MAPK p38. Nous avons prolongé ce traitement 17 heures et nous avons observé une évolution dans la réponse cellulaire. Nous remarquons un effet de la concentration en toxine sur la quantité de MAPK p38 activée. Celle-ci décroît avec l'augmentation de la concentration. Ces résultats sont en opposition apparente avec les résultats du groupe de Cheng : nous aurions pensé que plus l'inhibition des Rho GTPases était importante, plus la phosphorylation de la MAPK p38 pourrait être possible, puisque l'action inhibitrice des Rho GTPases est progressivement levée. Cette observation est peut-être la conséquence d'un effet toxique de la toxine B, dépendant de sa concentration. Ou peut-être cet effet est-il la conséquence d'une activation de phosphatases qui serait dépendante de la concentration en toxine. C'est-à-dire que l'inhibition des Rho GTPases engendrerait une activation rapide de la MAPK p38 mais que la toxine B, ou peut-être l'inactivation des Rho GTPases elle-même, activerait parallèlement des phosphatases qui seraient alors responsable de l'inactivation de la MAPK p38 observée à plus long terme (Figure 4-1).

Nos résultats suggèrent donc que les Rho GTPases participent à la réponse des kératinocytes face à la déplétion du cholestérol, notamment à l'induction de la différenciation tardive. Or, l'implication des Rho GTPases dans la différenciation des kératinocytes a été montrée par McMullan et al. (2003) grâce à un effet très significatif de l'inhibition des Rho GTPases par la toxine C3 de *Clostridium botulinum*. Ces auteurs induisent l'entrée en différenciation des kératinocytes par leur mise en suspension de la culture et lorsqu'ils inhibent les Rho GTPases, le pourcentage de cellules exprimant l'involucrine chute de manière hautement significative, suggérant un rôle des Rho GTPases dans la différenciation des kératinocytes.

D'autre part, nous savons que dans la différenciation des kératinocytes par une déplétion en cholestérol, la régulation passe par les MAPK p38 (Jans & al., 2004). Lorsque nous utilisons la toxine B de *Clostridium difficile* pour inhiber les Rho GTPases dans des kératinocytes déplétés en cholestérol, nous observons aussi une diminution de l'activité de la MAPK p38 et donc une diminution de l'expression d'involucrine.

Bien sûr, pour aller plus loin et confirmer l'implication des Rho GTPases dans la modulation de la voie de signalisation des MAPK p38 conduisant à l'expression d'involucrine, il serait intéressant de réaliser une détection de l'involucrine par Western blot et/ou par Northern blot. Ceci nous permettrait en effet de voir si l'inhibition de la MAPK p38 observée après 18 heures par les concentrations croissantes en toxine se reflète sur le niveau d'expression de l'involucrine.

Pour affiner l'analyse des Rho GTPases impliquées, nous pourrions également utiliser des siRNA spécifiques des divers membres de la famille des Rho GTPases. En effet, la toxine inhibe tous les membres de la famille des Rho GTPases : Rho A, B et C, Cdc42 et Rac1, alors que la transfection des siRNA spécifiques nous permettrait d'étudier l'implication de chaque GTPase dans les phénomènes observés dans ce mémoire (Deroanne & al., 2005). Notons cependant que les kératinocytes normaux sont difficilement transfectables mais que l'étude des kératinocytes immortalisés pourra peut-être fournir des réponses à nos questions.

Dans la suite des expériences, nous avons recherché le rôle de la protéine ROCK, une sérine/thréonine kinase, qui est un effecteur connu des Rho GTPases et qui est impliquée dans les phénomènes de différenciation terminale et de prolifération des kératinocytes (McMullan & al., 2003).

Dans les kératinocytes témoins non déplétés, lorsque nous inhibons la protéine ROCK par des concentrations croissantes en inhibiteur, nous n'observons pas d'activation de la MAPK p38 après 1 heure. Peut-être cette durée d'incubation est-elle trop courte pour que cette voie soit activée. Après 18 heures, nous observons une activation importante de la voie des MAPK p38, qui ne semble pas dépendante de la concentration. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que lorsque l'on inhibe ROCK, on lève l'inhibition que la voie de Rho/ROCK impose sur les MAPK p38, mais comme les Rho GTPases sont toujours actives, il n'y aurait pas d'induction des phosphatases.

Suite à ces traitements la viabilité des kératinocytes diminue. Cette observation pourrait être la conséquence de l'activation importante de la voie des MAPK p38 qui est impliquée dans les mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire et d'apoptose (Eckert & al., 2002).

Dans les kératinocytes déplétés en cholestérol, les résultats en terme d'activation de la voie des MAPK p38 suite à l'incubation avec les concentrations croissantes en inhibiteur, sont différents. Cette observation est certainement à mettre en relation avec l'extraction de cholestérol qu'ont subi ces kératinocytes. En effet, la déplétion en cholestérol conduit à l'inactivation des Rho GTPases qui pourraient alors être impliquée dans les résultats observés. On peut émettre l'hypothèse que cette inhibition induit une signalisation qui aurait pour conséquence de contrecarrer les effets toxiques de l'inhibition de ROCK et de l'activation des MAPK p38. L'observation de la viabilité des kératinocytes, suggère l'intervention de signalisations favorisant la survie et la prolifération cellulaire telles que la voie des MAPK Erk 1 et 2 (Figure 4-1). Cette voie peut être activée par le récepteur de l'EGF lors d'une déplétion en cholestérol (Pike & Casey, 2002 ; Chen & Resh, 2002) et pourrait être dépendante de l'activité de la protéine ROCK. Néanmoins, nous ne savons pas de quelle manière cette voie pourrait être favorisée par l'inhibition de ROCK dans le cadre d'une déplétion en cholestérol.

4.4. La relation entre la MAPK p38 et HSP27

La phosphorylation d'HSP27 dépend de l'activité de la MAPK p38. En effet, une inhibition de la voie des MAPK p38 inhibe également la phosphorylation d'HSP27 (Jonak & al., 2004 ; Berkowitz & al., 2005). Cette relation existe aussi in vivo, car il est possible de mettre en évidence une relation entre la MAPK p38 et HSP27 passant par les MAPKAPK 2 et 3 (Kim & al., 2005) puisque l'administration d'un inhibiteur de la MAPK p38 (SB242235), par voie orale, chez des souris, supprime l'activation de la voie des MAPK p38 par les UVB et cela engendre l'inhibition des MAPKAPK 2 et 3, ainsi que d'HSP27. De plus, lors de la réalisation

de son mémoire en 2004, Conny Mathay a montré que l'inhibition de la MAPK p38 par les inhibiteurs PD169316 et SB202190 dans les kératinocytes se reflétait sur la phosphorylation d'HSP27. Toutes ces observations suggèrent qu'il existe, dans l'épiderme, une relation entre les MAPK p38 et HSP27.

L'une des premières expériences réalisées dans le cadre de mon mémoire était la mise en évidence de ce lien entre les deux protéines grâce à l'utilisation de deux inhibiteurs spécifiques de la MAPK p38 α et β . Les résultats obtenus concordent avec ceux de la littérature et ceux obtenus par Conny Mathay.

Par contre, nous avons étudié ces deux protéines dans le cadre de la déplétion en cholestérol et de l'inhibition des Rho GTPases ou de la protéine ROCK. Nous nous sommes vite aperçu que ce lien semblait disparaître dans le cadre de ces expériences. En effet, l'inhibition de la MAPK p38 par la toxine B ou l'inhibiteur Y-27632, ne se traduit pas par une inhibition de la phosphorylation d'HSP27. A ce propos, dans les premières expériences réalisées, nous avons remarqué que la phosphorylation d'HSP27 ne dépendait que partiellement de l'activité de la MAPK p38. Peut-être que dans les conditions auxquelles les kératinocytes sont soumis suite à la présence des inhibiteurs, une autre signalisation intervient sur l'activité d'HSP27 (Figure 4-1). Peut-être aussi que les inhibitions touchent une isoforme de la MAPK p38 qui n'agit pas sur la phosphorylation d'HSP27.

Pour approfondir l'étude de ce lien entre la MAPK p38 et HSP27, il serait intéressant de détecter par Western blot spécifiquement chaque isoforme de la MAPK p38 et de pouvoir les inhiber spécifiquement pour observer l'impact sur la phosphorylation d'HSP27. Cette recherche pourrait être aussi le cadre de l'utilisation de la transfection par des siRNA qui seraient alors spécifiques de chaque isoforme de la MAPK p38.

Nous pourrions également étudier ce qui se passe, en terme de phosphorylation, au niveau des intermédiaires connus entre les MAPK p38 et HSP27, c'est-à-dire les MAPKAPK 2 et 3. Nous pourrions voir si le profil de leur activité en fonction des différents traitements est semblable à celui que nous observons pour HSP27 ou pour la MAPK p38. Cela nous indiquerait peut-être si un quelconque effet de la toxine ou de l'inhibiteur intervient au niveau de cet intermédiaire.

4.5. Une perspective particulière : relation entre cholestérol et adhésion cellulaire.

L'extraction du cholestérol n'induit l'activation de la voie des MAPK p38 et d'HSP27 qu'à partir du stade de confluence

L'extraction du cholestérol ne semble induire l'expression d'involucrine via la voie des MAPK p38 qu'à partir du stade de confluence (Jans & al., 2004), c'est-à-dire à partir du moment où les kératinocytes établissent des jonctions étroites de type desmosome entre eux. Une étude très récente portant sur une pathologie appelée le pemphigus vulgaris (PV) nous montre qu'une déstabilisation des desmosomes de kératinocytes par les anticorps anti-desmogleïne3 (dsg-3) présents dans le sérum des patients atteints induit l'activation de la voie des MAPK p38 et d'HSP27 (Berkowitz et al., 2005). D'après ces auteurs, la phosphorylation d'HSP27 conduit à la rétraction des filaments d'actine et à la réorganisation du cytosquelette

avec comme conséquence au niveau de l'épiderme, le détachement des kératinocytes entre eux.

Étant donné que la liaison suprabasale des kératinocytes par des desmosomes ne se développe qu'à partir du stade de confluence dans notre modèle de culture, il est intéressant de noter que l'extraction du cholestérol ne modifie le phénotype qu'à partir de ce stade. Peut-être que la déplétion en cholestérol induit également une modification des liaisons d'ancrage entre kératinocytes en désorganisant les domaines membranaires correspondant aux desmosomes. Cela conduirait à l'activation de la voie des MAPK p38 que nous observons. C'est peut-être pour cette raison que nous voyons apparaître un léger arrondissement des cellules et des jonctions intercellulaires moins étroites lorsque nous privons les kératinocytes en culture de leur cholestérol. L'extraction du cholestérol pourrait engager des signalisations similaires à celles induites par la reconnaissance de la desmoglérine-3 par l'anticorps spécifique dans le pemphigus vulgaris.

Au vu de ces résultats, il serait intéressant d'étudier les conséquences de la déplétion en cholestérol sur les jonctions cellulaires, et particulièrement de voir si les desmosomes sont altérés suite à ce traitement.

En conclusion, le cholestérol apparaît comme un régulateur clé de nombreuses signalisations cellulaires. Les Rho GTPases lui étant associées, leur étude dans l'implication des signalisations induites par une perturbation de la composition en cholestérol membranaire est d'un intérêt grandissant. En effet, de nombreuses questions restent encore à élucider à ce sujet.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Aktories, K. Bacterial toxins that target Rho proteins. *J Clin Invest* 99, 827-9 (1997).
- Aktories, K. Rho proteins: targets for bacterial toxins. *Trends Microbiol* 5, 282-8 (1997).
- Bang, B., Gniadecki, R. & Gajkowska, B. Disruption of lipid rafts causes apoptotic cell death in HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol* 14, 266-72 (2005).
- Berkowitz, P. et al. Desmosome signaling: Inhibition of p38MAPK prevents pemphigus vulgaris IgG induced cytoskeleton reorganization. *J Biol Chem* (2005).
- Caffrey, D. R., O'Neill, L. A. & Shields, D. C. A method to predict residues conferring functional differences between related proteins: application to MAP kinase pathways. *Protein Sci* 9, 655-70 (2000).
- Cairns, J., Qin, S., Philp, R., Tan, Y. H. & Guy, G. R. Dephosphorylation of the small heat shock protein Hsp27 in vivo by protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* 269, 9176-83 (1994).
- Chen, X. & Resh, M. D. Cholesterol depletion from the plasma membrane triggers ligand-independent activation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 277, 49631-7 (2002).
- Cheng, H. et al. Stress kinase p38 mediates EGFR transactivation by hyperosmolar concentrations of sorbitol. *J Cell Physiol* 192, 234-43 (2002).
- Deroanne, C. F. et al. Cdc42 downregulates MMP-1 expression by inhibiting the ERK1/2 pathway. *J Cell Sci* 118, 1173-83 (2005).
- Eckert, R. L. Structure, function, and differentiation of the keratinocyte. *Physiol Rev* 69, 1316-46 (1989).
- Eckert, R. L. et al. Keratinocyte survival, differentiation, and death: many roads lead to mitogen-activated protein kinase. *J Invest Dermatol Symp Proc* 7, 36-40 (2002).
- Eckert, R. L., Sturniolo, M. T., Broome, A. M., Ruse, M. & Rorke, E. A. Transglutaminase function in epidermis. *J Invest Dermatol* 124, 481-92 (2005).
- Efimova, T., Broome, A. M. & Eckert, R. L. A regulatory role for p38 delta MAPK in keratinocyte differentiation. Evidence for p38 delta-ERK1/2 complex formation. *J Biol Chem* 278, 34277-85 (2003).
- Efimova, T., Broome, A. M. & Eckert, R. L. Protein kinase Cdelta regulates keratinocyte death and survival by regulating activity and subcellular localization of a p38delta-extracellular signal-regulated kinase 1/2 complex. *Mol Cell Biol* 24, 8167-83 (2004).
- Etienne-Manneville, S. & Hall, A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-35 (2002).
- Fu, Y., O'Connor, L. M., Shepherd, T. G. & Nachtigal, M. W. The p38 MAPK inhibitor, PD169316, inhibits transforming growth factor beta-induced Smad signaling in human ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 310, 391-7 (2003).

Bibliographie

- Garmyn, M. et al. Human keratinocytes respond to osmotic stress by p38 map kinase regulated induction of HSP70 and HSP27. *J Invest Dermatol* 117, 1290-5 (2001).
- Gerthoffer, W. T. & Gunst, S. J. Invited review: focal adhesion and small heat shock proteins in the regulation of actin remodeling and contractility in smooth muscle. *J Appl Physiol* 91, 963-72 (2001).
- Hildesheim, J., Awwad, R. T. & Fornace, A. J., Jr. p38 Mitogen-activated protein kinase inhibitor protects the epidermis against the acute damaging effects of ultraviolet irradiation by blocking apoptosis and inflammatory responses. *J Invest Dermatol* 122, 497-502 (2004).
- Hippenstiel, S. et al. Rho proteins and the p38-MAPK pathway are important mediators for LPS-induced interleukin-8 expression in human endothelial cells. *Blood* 95, 3044-51 (2000).
- Ishizaki, T. [Rho-mediated signal transduction and its physiological roles]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 121, 153-62 (2003).
- Jans, R., Atanasova, G., Jadot, M. & Poumay, Y. Cholesterol depletion upregulates involucrin expression in epidermal keratinocytes through activation of p38. *J Invest Dermatol* 123, 564-73 (2004).
- Jans, R. Etude du rôle des lysosomes et du cholestérol au cours de la différenciation des kératinocytes épidermiques. *Presses universitaires de Namur*, 179 pages (2004), (Thèse).
- Jonak, C. et al. The 27kD heat shock protein and MAPK signalling regulate the expression of differentiation-associated proteins in human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 123, A2 (2004).
- Kamaraju, A. K. & Roberts, A. B. Role of Rho/ROCK and p38 MAP kinase pathways in transforming growth factor-beta-mediated Smad-dependent growth inhibition of human breast carcinoma cells in vivo. *J Biol Chem* 280, 1024-36 (2005).
- Kim, A. L. et al. Role of p38 MAPK in UVB-induced inflammatory responses in the skin of SKH-1 hairless mice. *J. Invest. Dermatol.* 124, 1318-25 (2005).
- Kindas-Mugge, I. & Trautinger, F. Increased expression of the M(r) 27,000 heat shock protein (hsp27) in in vitro differentiated normal human keratinocytes. *Cell Growth Differ* 5, 777-81 (1994).
- Larsen, J. K., Yamboliev, I. A., Weber, L. A. & Gerthoffer, W. T. Phosphorylation of the 27-kDa heat shock protein via p38 MAP kinase and MAPKAP kinase in smooth muscle. *Am J Physiol* 273, L930-40 (1997).
- Mathay, C. Implication des protéines kinases C et de p38 MAPK dans la modulation des marqueurs de différenciation épidermiques dans les kératinocytes déplétés en cholestérol. 65 pages. (2004), (Mémoire).

Bibliographie

- McClaren, M. & Isseroff, R. R. Dynamic changes in intracellular localization and isoforms of the 27-kD stress protein in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 102, 375-81 (1994).
- McMullan, R. et al. Keratinocyte differentiation is regulated by the Rho and ROCK signaling pathway. *Curr Biol* 13, 2185-9 (2003).
- Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B. & Krepler, R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31, 11-24 (1982).
- Owicki, J. C. & McConnell, H. M. Lateral diffusion in inhomogeneous membranes. Model membranes containing cholesterol. *Biophys J* 30, 383-97 (1980).
- Pargellis, C. et al. Inhibition of p38 MAP kinase by utilizing a novel allosteric binding site. *Nat Struct Biol* 9, 268-72 (2002).
- Pichon, S., Bryckaert, M. & Berrou, E. Control of actin dynamics by p38 MAP kinase - Hsp27 distribution in the lamellipodium of smooth muscle cells. *J Cell Sci* 117, 2569-77 (2004).
- Pike, L. J. Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res* 44, 655-67 (2003).
- Pike, L. J. & Casey, L. Cholesterol levels modulate EGF receptor-mediated signaling by altering receptor function and trafficking. *Biochemistry* 41, 10315-22 (2002).
- Poumay, Y., Herphelin, F., Smits, P., De Potter, I. Y. & Pittelkow, M. R. High-cell-density phorbol ester and retinoic acid upregulate involucrin and downregulate suprabasal keratin 10 in autocrine cultures of human epidermal keratinocytes. *Mol Cell Biol Res Commun* 2, 138-44 (1999).
- Poumay, Y. & Pittelkow, M. R. Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. *J Invest Dermatol* 104, 271-6 (1995).
- Rajendran, L. & Simons, K. Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci* 118, 1099-102 (2005).
- Robinson, N. A., LaCelle, P. T. & Eckert, R. L. Involucrin is a covalently crosslinked constituent of highly purified epidermal corneocytes: evidence for a common pattern of involucrin crosslinking in vivo and in vitro. *J Invest Dermatol* 107, 101-7 (1996).
- Rogalla, T. et al. Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *J Biol Chem* 274, 18947-56 (1999).
- Schroeder, R., London, E. & Brown, D. Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12130-4 (1994).

Bibliographie

- Simons, K. & Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 31-9 (2000).
- Stoll, S. W., Kansra, S. & Elder, J. T. Keratinocytes outgrowth from human skin explant cultures is dependent upon p38 signaling. *Wound Rep Reg* 11, 346-53 (2003).
- Wano, C. et al. Protective role of HSP27 against UVC-induced cell death in human cells. *Exp Cell Res* 298, 584-92 (2004).
- Wong, J. W. et al. Ultraviolet B-mediated phosphorylation of the small heat shock protein HSP27 in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 115, 427-34 (2000).

Table des matières :

INTRODUCTION

1.1. INTRODUCTION.....	1
1.1.1. Généralités.....	1
1.1.1.1. Caractéristiques et fonctions	1
1.1.1.2. Structure histologique de la peau	2
1.1.2. L'épiderme	2
1.1.2.1. Structure de l'épiderme	2
1.1.2.2. Types cellulaires épidermiques	3
1.2. LA DIFFERENCIATION EPIDERMIQUE.....	5
1.2.1. La prolifération des cellules basales.....	5
1.2.2. La différenciation des kératinocytes	5
1.3. CHOLESTEROL ET KERATINOCYTES	7
1.3.1. Généralités.....	7
1.3.2. Le cholestérol membranaire	7
1.3.3. Les « lipid rafts ».....	7
1.3.4. L'extraction du cholestérol membranaire par la Méthyl- β cyclodextrine dans les kératinocytes.....	8
1.4. LES STRESS EPIDERMQUES.....	10
1.4.1. Généralités.....	10
1.4.2. La réponse épidermique face à un stress	10
1.4.3. Les voies de signalisation induites par un stress	10
1.5. LA MAP KINASE P38.....	12
1.5.1. Généralités.....	12
1.5.2. La MAP kinase p38.....	12
1.5.2.1. Les voies d'activation de la MAP kinase p38	13
1.5.2.2. La MAP kinase p38 et la différenciation des kératinocytes épidermiques ..	13
1.5.2.3. Cibles potentielles pour la MAP kinase p38	14
1.6. LES « HEAT SHOCK PROTEINS »	15
1.6.1. Aperçu général	15
1.6.1.1. Fonctions	15
1.6.1.2. Classification	15
1.6.2. La HSP27	15
1.6.2.1. Son rôle dans la prolifération et la différenciation épidermique	16
1.6.2.2. L'activation d'HSP27 et son expression en réponse à un stress	16
1.6.2.3. Implication d'HSP27 dans les voies de signalisation.....	16
1.7. LES RHO GTPASES	18
1.7.1. Aperçu sur les petites GTPases	18
1.7.2. La famille des Rho GTPases	18
1.7.2.1. Généralités.....	18
1.7.2.2. Les effecteurs de Rho	19
1.7.2.3. L'inhibition des Rho GTPases par la toxine B de <i>Clostridium difficile</i>	19
1.8. LES OBJECTIFS DU TRAVAIL.....	20

MATERIEL ET METHODES

2.1. LA CULTURE CELLULAIRE	22
2.1.1. Culture des kératinocytes épidermiques humains	22
2.1.1.1. Matériel	22
2.1.1.2. Méthode.....	22
2.2. TRAITEMENTS DES KERATINOCYTES	24
2.2.1. Inhibition de la MAP kinase p38.....	24
2.2.2. Extraction du cholestérol membranaire par la méthyl-beta-cyclodextrine	24
2.2.3. Inhibition des Rho GTPases par la toxine B de Clostridium difficile.....	24
2.2.4. Inhibition de ROCK par la molécule Y-27632	25
2.2.5. Choc hyperosmotique au sorbitol.....	25
2.3. TEST MTT.....	26
2.4. ANALYSE DES PROTEINES PAR WESTERN BLOT.....	27
2.4.1. Matériel	27
2.4.2. Méthode.....	27
2.4.2.1. Extraction des protéines	27
2.4.2.2. Electrophorèse et transfert.....	27
2.4.2.3. Révélation de la membrane	28
2.5. ANALYSE DES ARN MESSAGERS POLY-A PAR NORTHERN BLOT	29
2.5.1. Extraction des ARNm poly-A	29
2.5.1.1. Matériel	29
2.5.1.2. Méthode.....	29
2.5.2. Electrophorèse et transfert sur membrane	31
2.5.2.1. Matériel	31
2.5.2.2. Méthode.....	31
2.5.3. Hybridation de la membrane avec des sondes d'ADNc marquées au ³² P.....	32
2.5.3.1. Matériel	32
2.5.3.2. Méthode.....	32

RESULTATS

3.1. PRESENTATION DU MODELE DE CULTURE DES KERATINOCYTES	
EPIDERMQUES HUMAINS	34
3.1.1. Morphologie de la culture cellulaire en microscopie à contraste de phase.....	34
3.1.2. Expression de différents marqueurs de différenciation épidermique en terme d'ARN messagers.....	34
3.2. CARACTERISATION DE L'EXPRESSION ET DE L'ACTIVATION DE LA MAP KINASE P38 ET DE HSP27 DANS LE MODELE DE DIFFERENCIATION DES KERATINOCYTES	36
3.2.1. Expression d'HSP27 en fonction de la densité cellulaire	36
3.2.2. Activation de la MAP kinase p38 et d'HSP27 en fonction du stade de culture...	36
3.2.3. Observation d'un lien entre l'activité de la MAP kinase p38 et celle d'HSP27 dans les kératinocytes en différenciation	37
3.2.3.1. Observation au niveau protéique.....	37
3.2.3.2. Observation des effets des inhibiteurs de la MAPK p38 au niveau de l'expression de marqueurs de différenciation	38

3.3. LES VOIES DE SIGNALISATION INDUITES PAR L'EXTRACTION DU CHOLESTEROL MEMBRANAIRE SUITE A UN TRAITEMENT A LA METHYL-β-CYCLODEXTRINE	39
3.3.1. Effets de la déplétion en cholestérol sur l'expression des marqueurs de différenciation	39
3.3.2. Recherche des effets de la déplétion en cholestérol, associée ou non à un traitement avec les inhibiteurs de la MAPK p38, sur la phosphorylation de la MAPK p38 elle-même et celle d'HSP27	40
3.3.2.1. Observation de l'activation de la MAPK p38 et d'HSP27.....	40
3.3.2.2. Observation de l'expression des ARNm d'HSP27 et de l'involucrine suite à la déplétion en cholestérol et à l'utilisation des inhibiteurs de la MAPK p38	41
3.3.3. Recherche de l'implication des Rho GTPases dans les voies de signalisation induites par la méthyl- β -cyclodextrine	41
3.3.3.1. Observation des effets de la toxine B de <i>Clostridium difficile</i> sur la phosphorylation de la MAPK p38 et d'HSP27 dans le cadre d'une déplétion en cholestérol pendant 1 heure.....	42
3.3.3.2. Observation des effets de la toxine B de <i>Clostridium difficile</i> sur la phosphorylation de la MAPK p38 et d'HSP27 lors d'une déplétion du cholestérol de 18 heures.....	43
3.3.3.3. Evaluation de la viabilité cellulaire grâce au test MTT suite aux traitements de 1 heure et de 18 heures avec la toxine B de <i>Clostridium difficile</i>	43
3.3.4. Rôle de la protéine ROCK en tant qu'intermédiaire dans la voie de signalisation induite par l'extraction du cholestérol et les Rho GTPases	44
3.3.4.1. Effets de l'inhibition de la protéine ROCK sur la phosphorylation de la MAPK p38 et d'HSP27 lors d'une déplétion de 1 heure en cholestérol.....	45
3.3.4.2. Effets de l'inhibition de la protéine ROCK sur la phosphorylation de la MAPK p38 et d'HSP27 lors d'une déplétion de 18 heures en cholestérol	45
3.3.4.3. Evaluation de la viabilité cellulaire suite à des traitements de 1 et 18 heures avec l'inhibiteur de la protéine ROCK.....	46

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

4.1. La voie des MAPK p38 est impliquée dans la régulation de l'expression d'involucrine lors de la différenciation des kératinocytes	48
4.2. L'implication de la MAPK p38 dans l'apparition du phénotype différencié lors du traitement par la M β CD	48
4.3. Les Rho GTPases en tant qu'initiateur de la voie de signalisation induite par l'extraction du cholestérol membranaire ?	49
4.4. La relation entre la MAPK p38 et HSP27	50
4.5. Une perspective particulière : relation entre cholestérol et adhésion cellulaire.....	51

BIBLIOGRAPHIE

